

# **Einfluss von Phosphodiesterase 4 und Proteinphosphatase 1 auf die Regulation proinflammatorischer Cytokine und Stickstoffmonoxid in Lipopolysaccharid- aktivierten Makrophagen**

Vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt

genehmigte  
**Dissertation**  
von

**Dipl. Biol. Sibylle Ohlweiler**  
aus Michelstadt-Vielbrunn

|                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| <b>Referentin:</b>                 | <b>Prof. Dr. K. Nixdorff</b> |
| <b>Koreferentin:</b>               | <b>Prof. Dr. F. Pfeifer</b>  |
| <b>Tag der Einreichung:</b>        | <b>09. September 2005</b>    |
| <b>Tag der mündlichen Prüfung:</b> | <b>28. Oktober 2005</b>      |

**Darmstadt 2005  
D 17**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Kathryn Nixdorff in der Zeit von Juni 2002 bis September 2005 am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Teilergebnisse dieser Arbeit werden in Kürze zur Publikation eingereicht:

**Ohlweiler, S., P. Skrablin, N. Runkel, M.J. Fenton, K. Nixdorff, and D. Schilling-Leiß.** 2006. Phosphodiesterase 4 and protein phosphatase 1 play prominent roles in the negative regulation of IL-1 $\beta$  production in macrophages. *prepared for submission for publication in: Journal of Immunology.*

**Ohlweiler, S., G. Kallifatidis, K. Nixdorff, and D. Schilling-Leiß.** 2006. Differential roles of protein phosphatase 1 in the regulation of TNF $\alpha$ , IL-6 and NO production in macrophages. *prepared for submission for publication in: Cytokine.*

Unanfechtbare Weisheiten gibt es überhaupt nicht,  
und wenn es sie gäbe, wären sie langweilig.

*Theodor Fontane, 1818 – 1898*

**In liebevoller Erinnerung  
an meinen Vater**

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kathryn Nixdorff für die Möglichkeit zu dieser wissenschaftlich sehr interessanten Arbeit. Durch ihre freundliche, verständnisvolle Art und ihre stete Diskussionsbereitschaft förderte sie ein von Vertrauen geprägtes Arbeitsklima, das in hohem Maße zum erfolgreichen Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Das Koreferat wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Felicitas Pfeifer übernommen, deren Bemühungen um das Graduiertenkolleg 340 die vorliegende Arbeit aus finanzieller Sicht überhaupt erst ermöglichten.

Dr. Dagmar Schilling-Leiß hat neben Waltraud Ruiner viel Engagement, Zeit und Geduld in meine wissenschaftliche Ausbildung investiert und mich maßgeblich in die Techniken von Molekularbiologie und Zellkultur eingeführt. An dieser Stelle möchte ich ihr herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre Freundschaft danken. Der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit ist zu guten Teilen auch ihr Verdienst.

Auf jeden Fall danken möchte ich außerdem Dipl. Biol. Sandro Conrad, der mir durch seine freundliche Unterstützung und seinen aufmunternden Humor das Leben oftmals leichter machte und den Laboralltag in wissenschaftlicher und in menschlicher Hinsicht bereicherte.

Die Diplomarbeiten von Petra Skrablin, Georgios Kallifatidis und Nadine Runkel entstanden im Zeitraum dieser Arbeit und beinhalteten Aspekte der vorliegenden Dissertation. Ihre engagierte Mitarbeit, ihre vielfältigen Fragen und die aus ihren Arbeiten resultierenden Antworten waren für mich zu gleichen Teilen Freude und Herausforderung. Ihnen danke ich, wie auch weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, für die direkte oder indirekte Unterstützung meiner Arbeit.

Für manch wissenschaftlichen Ratschlag fühle ich mich gegenüber Dr. Alexander Treusch und Dr. Peter Zimmermann wie auch gegenüber der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Layer für die freundliche Überlassung der Computer zu densitometrischen Auswertungen zu Dank verpflichtet.

Meiner Familie, besonders meiner Mutter, meinem Bruder Peter und meinen Großeltern, bin ich sehr dankbar für die liebevolle Unterstützung, die ich immer wieder erfahren habe. Ihre Zuversicht hat mich viele Male herausgefordert, bestärkt und ermutigt.

Markus danke ich herzlich für seinen Optimismus und seine Geduld in schwierigen Tagen. In vielerlei Hinsicht ging er mir als gutes Vorbild voran. Ich bin sehr froh, ihn an meiner Seite zu haben.

## Abkürzungsverzeichnis

### Verwendete Einheiten

|    |                  |       |                      |     |                              |
|----|------------------|-------|----------------------|-----|------------------------------|
| A  | Ampère           | m     | Milli- ( $10^{-3}$ ) | p   | Pico- ( $10^{-12}$ )         |
| bp | Basenpaare       | M     | Molar                | rpm | <i>revolution per minute</i> |
| Da | Dalton           | min   | Minute               | s   | Sekunde                      |
| g  | Gramm            | $\mu$ | Mikro- ( $10^{-6}$ ) | U   | <i>unit</i>                  |
| k  | Kilo- ( $10^3$ ) | n     | Nano- ( $10^{-9}$ )  | V   | Volt                         |
| l  | Liter            | OD    | optische Dichte      | v/v | <i>volume per volume</i>     |
|    |                  |       |                      | w/v | <i>weight per volume</i>     |

### Abkürzungen für einige Proteine der intrazellulären Signaltransduktion

|                  |   |
|------------------|---|
| AP-1             | <i>activator protein 1</i>  |
| CD               | <i>cluster of differentiation</i>   |
| CREB             | <i>cAMP-response element-binding protein</i>  |
| cUE PKA          | katalytische Untereinheit der Proteinkinase A   |
| Erk              | <i>extracellular signal-regulated kinase</i>  |
| Fos              | <i>cellular proto-oncogenic homologue of the v-fos oncogene of Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus</i>      |
| I $\kappa$ B     | Inhibitor von NF- $\kappa$ B  |
| IKK              | I $\kappa$ B-Kinasen  |
| IRAK             | <i>interleukin-1-receptor-associated kinase</i>   |
| JNK              | <i>Jun N-terminal kinase</i>  |
| Jun              | <i>cellular proto-oncogenic homologue of the v-jun oncogene of arenaviruses Junin</i>                                   |
| MAP-Kinase       | <i>mitogen-activated protein kinase</i>   |
| MAPK-Kinase      | <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>  |
| MEK              | <i>MAP extracellular signal-regulated kinase</i>  |
| MKK              | <i>MAP kinase kinase</i>  |
| MyD88            | <i>myeloid differentiation factor 88</i>  |
| NF- $\kappa$ B   | <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>  |
| NF-IL-6          | <i>nuclear factor interleukin 6</i>   |
| NIK              | <i>NF-<math>\kappa</math>B inducing kinase</i>  |
| p38              | <i>38 kDa protein kinase</i>  |
| PGE              | Prostaglandin E   |
| PKA              | Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase)  |
| PKC              | Proteinkinase C (Calcium-abhängige Proteinkinase)   |
| PLA <sub>2</sub> | Phospholipase A <sub>2</sub>  |
| PU.1             | <i>purine-rich motif transcriptionfactor 1</i>  |
| Raf              | <i>cellular proto-oncogenic homologue of the v-raf oncogene of Harvey sarcoma virus</i>                                 |
| Ras              | <i>cellular proto-oncogenic homologue of the v-ras oncogene of rat sarcoma virus</i>                                    |
| Rel              | <i>cellular proto-oncogenic homologue of the v-rel oncogene of avian leukaemogenic reticuloendotheliosis retrovirus</i> |
| SAPK             | <i>stress-activated protein kinase</i>  |
| Src              | <i>cellular proto-oncogenic homologue of the v-src oncogene of rous sarcoma virus</i>                                   |
| TLR              | <i>toll-like receptor</i>   |
| TRADD            | <i>TNF-RI-associated death domain protein</i>   |
| TRAF             | <i>tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>   |

## Sonstige Abkürzungen

|                   |  |
|-------------------|--|
| Amp               | Ampicillin   |
| ATCC              | <i>American type culture collection</i>              |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                  |
| cAMP              | cyclisches Adenosinmonophosphat                      |
| Caspase           | cysteinyl aspartate-specific proteinases             |
| CAT               | Chloramphenicol-Acetyltransferase                    |
| CD                | <i>cluster of differentiation</i>                    |
| CD14              | LPS im Kontext mit LBP-bindender Oberflächenrezeptor |
| cDNA              | ein der mRNA komplementärer Strang                   |
| CSP-Promotor      | <i>cap-site proximal</i> -Promotor                   |
| CSPD              | Substrat der alkalischen Phosphatase                 |
| COX               | Cyclooxygenase                                       |
| DMEM              | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>              |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid                                     |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                               |
| DTT               | Dithiothreitol                                       |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure                         |
| ELISA             | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>             |
| FCS               | <i>fetal calf serum</i>                              |
| HEPES             | Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure                |
| HPLC              | <i>high performance liquid chromatography</i>        |
| HRP               | <i>horseradish-peroxidase</i>                        |
| HSV               | <i>Herpes simplex Virus</i>                          |
| ICE (Caspase -1)  | IL-1 $\beta$ <i>converting enzyme</i>                |
| IL                | Interleukin  |
| IL-1R             | Interleukin-1-Rezeptor                               |
| LB                | Luria-Bertani  |
| LDH               | Lactatdehydrogenase                                  |
| LPS               | Lipopolysaccharid                                    |
| LPS-RR            | <i>LPS responsive region</i>                         |
| LBP               | LPS-bindendes Protein                                |
| MHC               | <i>major histocompatibility complex</i>              |
| MOPS              | 3-Morpholinpropansulfonsäure                         |
| mRNA              | <i>messenger-RNA</i>                                 |
| NADH <sub>2</sub> | Nicotinamidadenindinukleotid                         |
| PAGE              | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                      |
| PBS               | <i>phosphate buffered saline</i>                     |
| PEG               | Polyethylenglycol                                    |
| PMA               | Phorbolmyristatacetat                                |
| PP                | Proteinphosphatase                                   |
| PTAL              | TATA-ähnliche Promotor-Region                        |
| PTK               | Proteintyrosinkinase                                 |
| PTP               | Proteintyrosinphosphatase                            |
| RNA               | Ribonukleinsäure                                     |
| rRNA              | ribosomale RNA                                       |
| SDS               | <i>saline sodium citrat</i>                          |
| SSC               | Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer                  |
| SSPE              | <i>saline sodiumphosphat</i> EDTA                    |
| TE                | Tris / EDTA  |
| TEMED             | Tetramethylethylendiamin                             |
| TIR-Domäne        | <i>Toll/IL-1R homology domain</i>                    |
| TK                | Thymidin-Kinase                                      |
| TNF               | Tumornekrosefaktor                                   |
| TNF-R             | Tumornekrosefaktor-Rezeptor                          |
| UV                | Ultraviolett   |

## Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>I. Einleitung</b>  | 1  |
| <b>1. Das Immunsystem</b>   | 1  |
| 1.1. Die Entwicklung und Reifung von Makrophagen                        | 2  |
| 1.2. Allgemeine Funktionen von Makrophagen                              | 3  |
| <b>2. Das Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien</b>                | 3  |
| <b>3. Die LPS-induzierte Aktivierung von Makrophagen</b>                | 4  |
| <b>4. Intrazelluläre Signalkaskaden nach LPS-Aktivierung</b>            | 7  |
| 4.1. Tyrosinkinasen   | 7  |
| 4.2. Die klassischen MAP-Kinase-Wege                                    | 7  |
| 4.3. Intrazelluläre Signaltransduktion über das Adaptermolekül MyD88    | 8  |
| 4.4. MyD88-unabhängige intrazelluläre Signaltransduktion                | 10 |
| 4.5. Der cAMP-abhängige Proteinkinase-A-Weg                             | 10 |
| <b>5. Potentielle Regulatoren des PKA-Weges</b>                         | 12 |
| 5.1. Phosphodiesterasen   | 12 |
| 5.2. Proteinphosphatasen  | 13 |
| <b>6. Transkriptionsfaktoren</b>  | 14 |
| 6.1. <i>cAMP-response element-binding protein</i> (CREB)                | 14 |
| 6.2. <i>Nuclear factor</i> $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)                  | 16 |
| 6.3. <i>Nuclear factor</i> IL-6 (NF-IL6)                                | 17 |
| 6.4. <i>Activator protein</i> (AP-1)                                    | 17 |
| 6.5. <i>Purine-rich motif transcription factor</i> (PU.1)               | 17 |
| <b>7. Die proinflammatorischen Cytokine</b>                             | 17 |
| 7.1. Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )                              | 18 |
| 7.1.1. LPS-induzierbare <i>cis-acting</i> Elemente im IL-1 $\beta$ -Gen | 18 |
| 7.2. Interleukin-6 (IL-6)   | 20 |
| 7.3. Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )                        | 20 |
| 7.4. Die Effekte proinflammatorischer Cytokine <i>in vivo</i>           | 21 |
| <b>8. Die LPS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid</b>           | 22 |
| 8.1. Die Regulation der induzierbaren NO-Synthase                       | 22 |
| 8.2. Biologische Effekte von Stickstoffmonoxid                          | 23 |
| 8.3. Der <i>oxidative burst</i>   | 24 |

|   |    |
|---|----|
| <b>II. Problemstellung</b>  | 25 |
| <b>III. Material &amp; Methoden</b>                                       | 27 |
| <b>1. Chemikalien</b>   | 27 |
| <b>2. Milli-Q-Wasser</b>  | 29 |
| <b>3. Zellkultur</b>  | 29 |
| 3.1. Die permanente Zelllinie RAW 264.7                                   | 29 |
| 3.2. Allgemeine Methoden  | 29 |
| 3.2.1. Sterilisation der verwendeten Materialien                          | 29 |
| 3.2.2. Bestimmung von Lebendzellzahl und Vitalität                        | 30 |
| 3.2.3. Langzeitkonservierung von Zellen                                   | 30 |
| 3.3. Medien, Zusätze und Lösungen   | 31 |
| 3.3.1. Das Grundmedium  | 31 |
| 3.3.2. Bestandteile des vollwertigen Kulturmediums                        | 31 |
| 3.3.3. Das Kulturmedium   | 32 |
| 3.4. Die Kultivierung der permanenten Zelllinie RAW 264.7                 | 32 |
| 3.5. Einsatz von Lipopolysaccharid  | 33 |
| 3.6. Einsatz von Reagenzien zur Modulation der Cytokin- und NO-Produktion | 33 |
| 3.6.1. Di-buturyl-cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat                   | 34 |
| 3.6.2. Der Phosphodiesterase 4-Inhibitor Rolipram                         | 34 |
| 3.6.3. Der Proteinphosphatase 1-Inhibitor Tautomycin                      | 34 |
| 3.7. Stimulierung und Inhibition der RAW 264.7-Makrophagen                | 35 |
| 3.8. Messung der Cytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase-Test           | 35 |
| 3.9. Nachweis der Cytokinproduktion mittels enzymgebundener Immuno-Assays | 36 |
| 3.9.1. Gewinnung von Überständen und Lysaten                              | 37 |
| 3.10. Nachweis der Produktion von Stickstoffmonoxid                       | 38 |
| 3.11. Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB       | 39 |
| 3.11.1. Herstellung der Gesamtzell-Lysate                                 | 39 |
| 3.11.2. Bestimmung der Proteinkonzentration                               | 39 |
| 3.11.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen               | 40 |
| 3.11.4. Western-Blot  | 41 |
| 3.11.5. Antikörper und Substrat für den Einsatz in der Western-Analyse    | 41 |
| 3.11.6. Durchführung des Western-Blot                                     | 42 |
| <b>4. Molekularbiologische Standardmethoden</b>                           | 43 |
| 4.1. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren                       | 43 |
| 4.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion von Nukleinsäuren        | 44 |
| 4.3. Fällern und Waschen von Nukleinsäuren                                | 44 |
| 4.4. Vermehrung und Isolierung von Plasmiden                              | 44 |



|   |    |
|---|----|
| 4.4.1. Herstellung chemisch-kompetenter Zellen  | 45 |
| 4.4.2. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen  | 46 |
| 4.4.3. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Zellen   | 46 |
| 4.5. Enzymatische DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen   | 46 |
| 4.6. Native DNA-Agarose-Gelelektrophorese   | 46 |
| <b>5. Northern Analysen zum Nachweis spezifischer mRNA</b>  | 46 |
| 5.1. Allgemeine Hinweise zum Arbeiten mit RNA   | 47 |
| 5.2. RNA-Isolierung aus Makrophagen   | 47 |
| 5.3. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit Formaldehyd   | 48 |
| 5.4. Überprüfung von Elektrophoreselauf und Qualität der aufgetrennten RNA                                      | 49 |
| 5.5. Northern-Blot  | 50 |
| 5.6. Prähybridisierung der Nylonmembran   | 50 |
| 5.7. Strangspezifische RNA-Sonden   | 51 |
| 5.8. Digoxigenin (DIG)-Markierung der RNA-Sonden  | 51 |
| 5.9. Hybridisierung der Membran   | 52 |
| 5.10. Densitometrische Auswertung der Northern-Analyse-Filme  | 53 |
| <b>6. Ermittlung der Promotoraktivität</b>  | 53 |
| 6.1. Promotor-Reportergen-Konstrukte  | 53 |
| 6.1.1. Der Luciferase-Expressionsvektor pXT-luc   | 54 |
| 6.1.2. Der Luciferase-Expressionsvektor pX2-HT-luc  | 54 |
| 6.1.3. Der Luciferase-Expressionsvektor pCRE-luc  | 55 |
| <b>7. Die Transfektion</b>  | 56 |
| 7.1. Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation   | 56 |
| 7.1.1. Durchführung der Transfektion  | 56 |
| 7.1.2. Stimulierung und Inhibition der transfizierten Zellen  | 56 |
| 7.2. Reportergen-Assay der Luciferase-Aktivität   | 57 |
| <b>8. Statistische Methoden</b>   | 58 |
| <b>IV. Ergebnisse</b>   | 59 |
| <b>1. Untersuchungen zur Regulation von IL-1<math>\beta</math> in RAW 264.7-Makrophagen</b>                     | 59 |
| 1.1. Einsatz von dB-cAMP zur Modulierung der IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen | 59 |
| 1.1.1. Konzentrationsabhängiger Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -Produktion                           | 59 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.1.2. Ermittlung der geeigneten dB-cAMP-Konzentration.....  | 60        |
| 1.1.3. Zeitkinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP auf die<br>IL-1 $\beta$ -Produktion.....  | 61        |
| 1.1.4. Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation.....   | 62        |
| 1.2. Inhibition der Phosphodiesterase 4 zur Modulation der IL-1 $\beta$ -Produktion<br>in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen.....  | 64        |
| 1.2.1. Konzentrationsabhängiger Einfluss von Rolipram.....   | 64        |
| 1.2.2. Ermittlung der geeigneten Rolipram-Konzentration.....   | 65        |
| 1.2.3. Zeitkinetische Studien zum Einfluss von Rolipram.....   | 65        |
| 1.2.4. Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation.....  | 66        |
| 1.2.5. Einfluss von Rolipram auf die vollständige humane IL-1 $\beta$ - <i>Enhancer</i> -<br>Promotorregion.....                       | 68        |
| 1.2.6. Einfluss von Rolipram auf die minimale humane IL-1 $\beta$ - <i>Enhancer</i> -<br>Promotorregion.....                           | 69        |
| 1.2.7. Einfluss von Rolipram auf die Promotor-Aktivierung im Expressionsvektor<br>pCRE-luc.....  | 71        |
| 1.2.8. Einfluss von Rolipram auf die Phosphorylierung von CREB.....  | 72        |
| 1.3. Inhibition der Proteinphosphatase 1 zur Modulation der IL-1 $\beta$ -Produktion<br>in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen..... | 73        |
| 1.3.1. Ermittlung der geeigneten Tautomycin-Konzentration.....   | 73        |
| 1.3.2. Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -Produktion.....   | 74        |
| 1.3.3. Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation.....  | 75        |
| 1.3.4. Einfluss von Tautomycin auf die vollständige humane IL-1 $\beta$ - <i>Enhancer</i> -<br>Promotor-Region.....                    | 77        |
| 1.3.5. Einfluss von Tautomycin auf die minimale humane IL-1 $\beta$ - <i>Enhancer</i> -<br>Promotor-Region.....                        | 78        |
| 1.3.6. Einfluss von Tautomycin auf die Promotoraktivität in pCRE-luc.....  | 79        |
| 1.3.7. Einfluss von Tautomycin auf die Phosphorylierung des<br>Transkriptionsfaktors CREB.....   | 80        |
| <b>2. Untersuchungen zur Regulation von TNF<math>\alpha</math> in LPS-stimulierten<br/>RAW 264.7-Makrophagen.....</b>                  | <b>81</b> |
| 2.1. Einfluss von cAMP auf die TNF $\alpha$ -Produktion.....   | 81        |
| 2.2. Einfluss von Rolipram auf die TNF $\alpha$ -Produktion.....   | 82        |
| 2.2.1. Einfluss von Rolipram auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation.....  | 83        |
| 2.3. Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -Produktion.....   | 84        |
| 2.3.1. Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation.....  | 85        |
| <b>3. Untersuchungen zur Regulation von IL-6 in LPS-stimulierten<br/>RAW 264.7-Makrophagen.....</b>                                    | <b>86</b> |
| 3.1. Einfluss von dB-cAMP auf die IL-6-Produktion.....   | 86        |
| 3.2. Einfluss von Rolipram auf die IL-6-Produktion.....  | 87        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3. Einfluss von Tautomycin auf IL-6-Produktion.....  | 88         |
| <b>4. Die Produktion von Stickstoffmonoxid.....</b>  | <b>89</b>  |
| 4.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von Stickstoffmonoxid.....  | 89         |
| 4.2. Einfluss von Rolipram auf die Stickstoffmonoxid-Produktion.....   | 90         |
| 4.3. Einfluss von Tautomycin auf die Produktion von Stickstoffmonoxid.....   | 91         |
| <b>V. Diskussion.....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>1. Die differenzierte Regulation der Produktion der proinflammatorischen Cytokine IL-1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math> und IL-6.....</b>                  | <b>93</b>  |
| <b>2. Kinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die IL-1<math>\beta</math>-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen.....</b> | <b>94</b>  |
| 2.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$ .....   | 95         |
| 2.2. Einfluss von Rolipram auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$ .....  | 95         |
| 2.3. Einfluss von Tautomycin auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$ .....  | 96         |
| <b>3. Promotoraktivitätsstudien zum Einfluss von Rolipram und Tautomycin auf das humane IL-1<math>\beta</math>-Gen.....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>4. Kinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die TNF<math>\alpha</math>-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen.....</b> | <b>99</b>  |
| 4.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von TNF $\alpha$ .....  | 100        |
| 4.2. Einfluss von Rolipram auf die Regulation und Produktion von TNF $\alpha$ .....  | 100        |
| 4.3. Einfluss von Tautomycin auf die Regulation und Produktion von TNF $\alpha$ .....  | 101        |
| <b>5. Kinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-induzierte Produktion von IL-6 in RAW 264.7-Makrophagen.....</b>                | <b>101</b> |
| 5.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von IL-6.....   | 101        |
| 5.2. Einfluss von Rolipram auf die Produktion von IL-6.....  | 102        |
| 5.3. Einfluss von Tautomycin auf die Produktion von IL-6.....  | 102        |
| <b>6. Zusammenfassender Überblick über die Regulation der proinflammatorischen Cytokine IL-1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math> und IL-6.....</b>               | <b>102</b> |
| <b>7. Überlegungen zur Differenzierung der Signalwege zur Produktion von IL-1<math>\beta</math>, TNF<math>\alpha</math> und IL-6.....</b>                              | <b>103</b> |
| 7.1. Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren CREB vs. NF- $\kappa$ B für die Produktion proinflammatorischer Cytokine.....  | 103        |
| <b>8. Untersuchungen zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid in RAW 264.7-Makrophagen.....</b>       | <b>105</b> |

|   |     |
|---|-----|
| 9. Kontrollen über die Expression der Cytokingene durch Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen im Zusammenhang mit dem <i>oxidative burst</i> ..... | 107 |
| 10. Ausblick .....  | 108 |
| <b>VI. Zusammenfassung</b> .....  | 110 |
| Abstract / Englische Übersetzung der Zusammenfassung .....  | 112 |
| <b>VII. Literatur</b> .....   | 114 |
| <b>VIII. Anhang</b> .....   | 129 |
| Wertetabellen zu den Abbildungen .....  | 129 |
| Lebenslauf .....  | 136 |

# I. Einleitung

## 1. Das Immunsystem

Jeder Organismus ist den äußeren physikalischen Faktoren und den fremden Organismen seiner Umwelt permanent auf verschiedenste Weise ausgesetzt. Zum Schutz vor Angriffen pathogener Fremdorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Würmer) stellt das Immunsystem<sup>1</sup> von Wirbeltieren einen hochentwickelten, komplexen Abwehrmechanismus dar. Durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen zellulären und humoralen<sup>2</sup> Bestandteilen der angeborenen und der erworbenen Immunität wird der Organismus geschützt.

Von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Immunabwehr ist die Fähigkeit des Immunsystems, körpereigene von körperfremden Komponenten zu unterscheiden. Sobald ein körperfremder Partikel in den Organismus eindringt, wird er durch die angeborene, unspezifische Immunabwehr als Fremdsubstanz erkannt und seine Beseitigung eingeleitet. In nahezu allen multizellulären Organismen ist diese phylogenetisch-konservierte Art der Immunabwehr in unterschiedlicher Weise ausgeprägt.

Die adaptive (erworbene) Immunität von Vertebraten zeichnet sich gegenüber der angeborenen Immunabwehr durch eine Spezifität gegenüber Fremdsubstanzen aus. Körperfremde Peptid-Antigene werden durch die Antigen-Rezeptoren auf B- und T-Zellen<sup>3</sup> erkannt. Durch die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses kann ein erneuter Angriff eines bereits vom Immunsystem erkannten Fremdkörpers daher deutlich schneller und gezielter erfolgen.

Die Makrophagen (Abb. 1) spielen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort eine zentrale Rolle. Innerhalb weniger Minuten nach dem Kontakt mit einer Fremdsubstanz werden Makrophagen aktiviert, was durch die Expression sogenannter „früher“ Gene deutlich wird [Auron & Webb, 1994]. Diese Gene codieren u.a. für die pro-inflammatorischen Cytokine Interleukin (IL) 1 $\beta$ , IL-6 sowie Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ . Diese Proteinhormone üben innerhalb des Immunsystems zahlreiche regulatorische Funktionen aus und verstärken dessen Aktivität.

Negative Aspekte der Cytokine werden hingegen deutlich, wenn die Produktion dieser Entzündungsmediatoren unkontrolliert über einen längeren Zeitraum erfolgt. Die Folge können Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoide Arthritis sein. Diese Krankheit ist durch eine chronische Entzündung mit Gewebeschädigungen in den Gelenken gekennzeichnet, die durch die anhaltende Ausschüttung der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  verursacht wird.

---

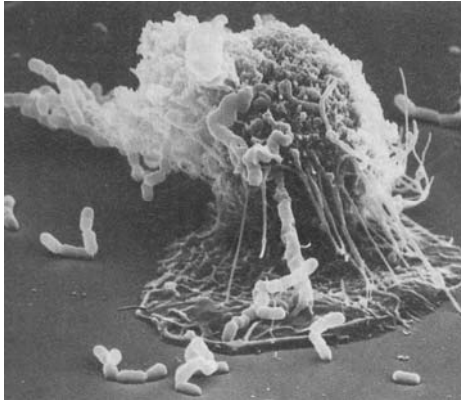
<sup>1</sup> lat.: immunis = frei

<sup>2</sup> Humores = Körperflüssigkeiten; Antikörper-vermittelte Immunantwort zum Schutz der Extrazellularräume

<sup>3</sup> Lymphocyten; Reifung im Thymus (T) bzw. im Knochenmark (*bone-marrow*; B)

### 1.1. Die Entwicklung und Reifung von Makrophagen

Makrophagen<sup>4</sup> (einkernige Phagocyten) kommen in vielen Körpergeweben vor und sind für das angeborene Immunsystem von zentraler Bedeutung. Diese Zellen repräsentieren eine Familie mononukleärer Leukocyten, die inner- und außerhalb der lymphatischen Organe<sup>5</sup> weit im Körper verteilt vorkommen.



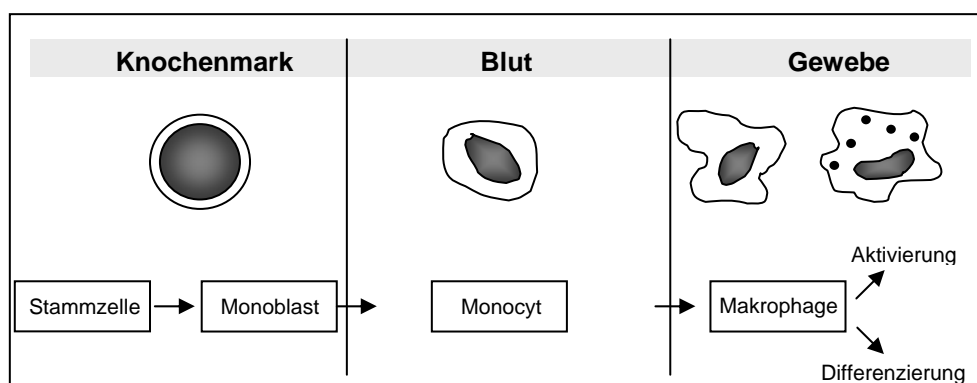
**Abb. 1: Phagozytierender Makrophage**

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Fotografie eines Makrophagen, der mit seinen fädigen Pseudopodien stäbchenförmige Bakterien festhält, in sich aufnimmt und verdaut.

© Lennart Nilsson [aus: Biologie, N.A. Campbell, Spektrum Akademischer Verlag, 1997, S. 935]

Hinsichtlich ihrer Lebensdauer und ihres Phänotyps variieren Makrophagen sehr stark in Abhängigkeit ihres Ursprungs und ihrer lokalen Umgebung. Im Gewebe verankerte Makrophagen findet man u.a. in der Leber (Kupffer-Zellen), in der Lunge (Alveolarmakrophagen) und im Zentralnervensystem (Microglia-Zellen) [Abbas et al., 1997]. In ungebundener Form bewegen sich Makrophagen mit Hilfe von Lamellipodien fort.

Wie alle zellulären Bestandteile des Blutes entwickeln sich Makrophagen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (Abb. 2). Die Vorläuferzellen von Makrophagen werden als Monoblasten bezeichnet, die im Blutkreislauf zu Monocyten heranreifen.



**Abb. 2: Der Reifungsprozess mononukleärer Phagocyten**

[modifiziert nach Abbas et al., 1997]

<sup>4</sup> gr.: makros = groß; phagein = fressen (große Fresszelle)

<sup>5</sup> primär: Thymus, Knochenmark; sekundär: Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques, mucosa-assoziierte Gewebe

Monocyten verbleiben etwa drei Tage im Blutkreislauf, verlassen diesen mittels Diapedese<sup>6</sup>, um in das umliegende Gewebe zu gelangen. Hier findet die Reifung zu Makrophagen statt, die einen Durchmesser von 25 – 50 µm besitzen [Klein, 1991].

## 1.2. Allgemeine Funktionen von Makrophagen

Makrophagen stellen als die größten Phagocyten die erste Abwehrlinie gegenüber körperfremden Antigenen dar und sind daher von zentraler Bedeutung für das angeborene Immunsystem. Fremdpartikel, aber auch abgestorbenes, körpereigenes Gewebe [Campbell, 1997] werden mittels Phagocytose aufgenommen, in niedermolekulare Fragmente gespalten und weiteren Zellen des Immunsystems (T<sub>H</sub>1-Zellen) im Komplex mit MHC<sup>7</sup>II-Molekülen auf der Zelloberfläche zur Auslösung einer Immunantwort präsentiert. Neben ihrer Antigen-präsentierenden Eigenschaft sind sie von großer Bedeutung für die Regulation der T-Zell-Funktion, die Regulation der Antikörper-Bildung durch B-Zellen sowie deren Proliferation und für die Produktion von Mediatormolekülen der zellulären Immunantwort. Viele dieser Aktivitäten werden durch proinflammatorische Cytokine vermittelt [Nathan, 1987], die hauptsächlich von Makrophagen produziert werden.

Ausgehend von einem ruhenden Stadium können Makrophagen durch eine Vielzahl von Substanzen aktiviert werden. Hierzu zählen Peptidoglykane, Lipoarabinomannane und Lipoproteine. Als klassischer Aktivator der ruhenden Makrophagen gilt jedoch das Lipopolysaccharid (LPS) aus Gram-negativen Bakterien [Morrison & Ryan, 1987]. Zu den Funktionen der aktivierten Zellen zählen Phagocytose und Chemotaxis. Nach Klein [1991] können Makrophagen über den aktivierten Zustand hinaus durch Wechselwirkung mit T<sub>H</sub>1-Zellen und durch den Einfluss weiterer Effektoren (z.B. Interferon (IFN) γ) hyperaktiviert werden.

Als Folge von Aktivierung bzw. Hyperaktivierung sezernieren Makrophagen zudem eine Vielzahl von Substanzen, die der Regulation der Abwehrmechanismen des Organismus dienen. Diese Stoffe umfassen Lipide, Proteine sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen. Die durch die Stimulierung des Immunsystems positiv wirkenden Mediatoren können in hohen Konzentrationen aber auch negative Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben. Zu den schwerwiegendsten Folgen zählt der septische Schock mit häufig letalem Ausgang [Rietschel & Brade, 1993].

## 2. Das Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien

Aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung und verschiedener Komponenten der Zellwand, die dem osmotischen Innendruck der Zelle Widerstand leistet und dem Bakterium

---

<sup>6</sup> Wanderung von Granulocyten, Lymphocyten oder Makrophagen zwischen den Zellen eines Verbandes

<sup>7</sup> *major histocompatibility complex*

seine Form gibt, lassen sich Bakterien in zwei Großgruppen einteilen. Diese werden als Gram-positiv und als Gram-negativ bezeichnet.

Die Struktur der Gram-negativen Zellwand ist komplex und im Gegensatz zur Zellwand Gram-positiver Bakterien vielschichtig. Sie besteht aus äußerer Membran, periplasmatischem Raum mit Peptidoglykan und der Plasmamembran. In der äußeren Membran sowie der Plasmamembran sind Transmembranproteine integriert, wobei die äußere Membran im Gegensatz zur Cytoplasmamembran relativ permeabel für kleine Moleküle ist, da sie Porine enthält, die Kanäle für niedermolekulare, hydrophile Substanzen darstellen.

Das LPS-Molekül befindet sich auf der Oberfläche der äußeren Membran und besteht aus einem Lipidbereich, einem Kern-Polysaccharid-Abschnitt sowie einer O-spezifischen Polysaccharidkette. Der Lipidanteil wird auch als Lipid A bezeichnet, setzt sich aus phosphorylierten  $\beta$ -1,6-verknüpften Glucosaminidaccharid-Molekülen zusammen und ist mit einer variierenden Anzahl von Fettsäure-Molekülen verestert. Das Lipid A ist verantwortlich für den stimulierenden als auch den cytotoxischen Charakter der Endotoxine [Rietschel & Brade, 1993]. Der Kern-Polysaccharid-Bereich besteht aus verschiedenen Zuckermolekülen und ist kovalent mit dem Lipidanteil verknüpft. Die Zusammensetzung der O-spezifischen Polysaccharidkette variiert stark hinsichtlich der Art, der Reihenfolge und der Verknüpfung der Zuckermoleküle (u.a. Glucose, Galactose, Heptose, N-Acetylglucosamin, Ketodesoxyoctonat) [Madigan et al., 1997].

### 3. Die LPS-induzierte Aktivierung von Makrophagen

Nach Wright [1991] existieren drei Rezeptoren für die Wechselwirkung zwischen Makrophagen und LPS, von denen zwei (*Scavenger* Rezeptor und *cluster of differentiation* (CD) 18 Antigen) direkt an LPS binden können, jedoch keine Stimulation von Makrophagen zur Folge haben.

Die Bindung des dritten Rezeptors, CD14 (membranständig oder im Serum gelöst), an LPS hingegen setzt die vorherige Bindung an das LPS-bindende Protein (LBP; 60 kDa) voraus [Ulevitch & Tobias, 1995]. LBP ist ein effektiver *Carrier* von LPS und weiteren amphiphilen Molekülen im Serum [Schromm et al., 1996]. Bei CD14 handelt es sich um ein Glykoprotein (55 kDa), bei LBP um ein hauptsächlich in der Leber produziertes Serumprotein. Die Ausbildung des CD14/LBP-Komplexes führt bereits bei sehr geringen Konzentrationen von LPS zur deutlichen Aktivierung von Makrophagen [Perera et al., 1998], die hierdurch in verstärktem Maße Cytokine produzieren.

Arbeiten von Wright & Kolesnick [1995] ließen lange vermuten, dass es sich bei CD14 um ein LPS-transportierendes System zur Durchdringung der Zellmembran handeln könnte. Da das membran-verankerte Molekül jedoch weder eine Transmembrandomäne noch eine cytoplasmatische Region besitzt [Poltorak et al., 1998 b; Tsuneyasu & Shizuo, 2002], wurde die Beteiligung weiterer Faktoren und Rezeptoren für die Vermittlung einer Signaltransduktion stark angenommen [Lee et al., 1993].



Diese Vermutung wurde durch die Beschreibung einer unabhängig von CD14 ablaufenden Stimulierbarkeit erhärtet [Haziot et al., 1996], wenngleich CD14-*knockout*-Mäuse deutlich weniger sensitiv auf LPS reagieren. Es war ferner bekannt, dass Zellen der mutanten Mäusestämme C3H/HeJ [Sultzter, 1968] und C57BL/10cCr [Coutinho et al., 1977] nicht gegen LPS reagierten. Poltorak et al. [1998; a] schließlich gelang die Identifizierung dieses LPS-Response-Defekts (*Lps*<sup>d</sup>) als eine Punktmutation im *Tlr* (*toll-like receptor*) 4-Lokus von C3H/HeJ-Mäusen auf Chromosom 4.

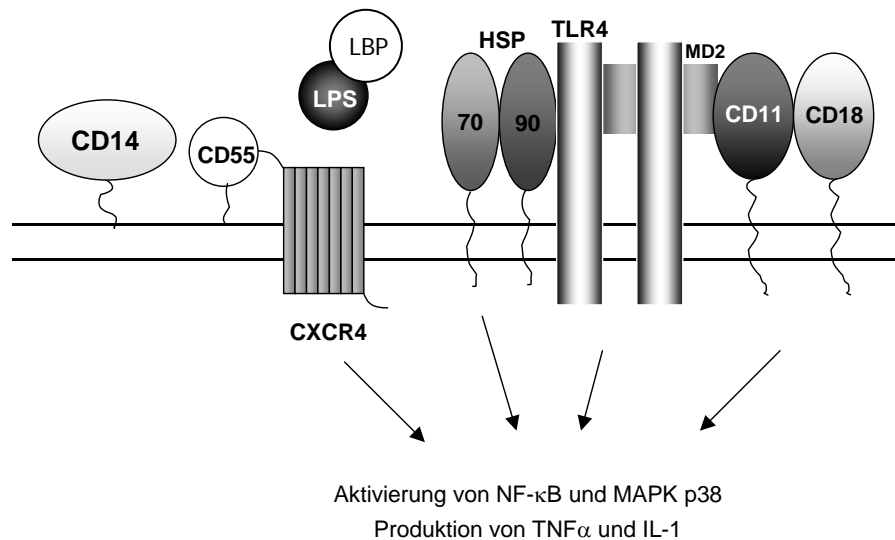
TLR4 wurde basierend auf diesen Untersuchungen als möglicher LPS-Rezeptor in Betracht gezogen. Dass TLR4 an der LPS-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist, belegen Untersuchungen mit Makrophagen und B-Zellen aus TLR4-*knockout*-Mäusen, die auf eine Stimulierung mit LPS nicht reagierten [Hoshino et al., 1999; Qureshi et al., 1999]. Im humanen System führten TLR4-Mutationsversuche zu vergleichbaren Resultaten [Schwartz, 2001]. Nach Tsuneyasu & Shizuo [2002] und Vegeto et al. [2004] scheint TLR4 hierbei als *Signal-Transducer* von CD14-gebundenem LPS zu fungieren. LPS wird zwar häufig als TLR4-Ligand bezeichnet [u.a. durch Barton & Medzhitov, 2003], doch konnte der durch Poltorak et al. [2000] beschriebene direkte Kontakt zwischen LPS und TLR4 durch weitere Arbeitsgruppen bislang nicht bestätigt werden [Triantafilou & Triantafilou, 2002; Akira, 2003].

TLRs erkennen konservierte Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen, die allgemein als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Neben Pilzen und Bakterien können wohl auch Viren durch TLRs spezifisch erkannt werden [Akira, 2003]. Zum ersten Mal entdeckt wurde das Transmembran-Protein Toll bei Untersuchungen zur Dorsal-Ventral-Entwicklung der Larven von *Drosophila melanogaster* [Anderson et al., 1985; Hashimoto et al., 1988]. Die Vertebraten-TLRs bestehen aus mehreren Leucin-reichen Wiederholungssequenzen in der extrazellulären Domäne, die phylogenetisch stark variieren, und einer konservierten Toll/*interleukin-1-receptor* (TIR)-homologen Domäne im cytoplasmatischen Bereich.

Untersuchungen von Triantafilou & Triantafilou [2002] zufolge wird die LPS-Erkennung und die LPS-induzierte Signaltransduktion über eine *Cluster*-Bildung verschiedener Komponenten in *lipid rafts* vermittelt (Abb. 3). *Lipid rafts* sind detergent-resistente Mikrodomänen, in denen verschiedene Proteine der Zellmembran angereichert vorliegen. Triantafilou & Triantafilou [2005] gehen davon aus, dass diese Bereiche eine Art Kompartimentierung für die Annäherung heterotypischer<sup>8</sup> Proteine darstellen.

---

<sup>8</sup> strukturell nicht verwandt; ungleich



**Abb. 3: Hypothetisches Modell der LPS-induzierten Immunreaktion**

Erläuterungen und Abkürzungen siehe Text

[modifiziert nach Triantafilou & Triantafilou, 2005]

Nach Freisetzung in den Blutkreislauf binden mehrere Moleküle LPS zunächst an LBP, das den Transfer von LPS an das membran-assoziierte CD14 katalysiert. Signalmoleküle wandern zur Stelle der LPS/CD14-Ligation, und LPS wird in die Lipid-Doppelschicht entlassen. Das Molekül bindet an einen Rezeptor-Komplex von Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4), *heat shock protein* (Hsp) 70 und 90 sowie möglicherweise CD55. In dieses Cluster werden weitere Moleküle aufgenommen, die vielfältige Signalkaskaden vermitteln. Zu diesen Signaltransduzierenden Komponenten zählen TLR4 im Komplex mit MD-2, einem sekretierten Glykoprotein für die Ligandenerkennung durch den LPS-Rezeptor, und womöglich weitere TLRs sowie die Integrine CD11 bzw. CD18 [Triantafilou & Triantafilou, 2005].

Die Bedeutung von MD-2 für die intrazelluläre Signaltransduktion konnte durch MD-2-defiziente Mäuse gezeigt werden, die einem LPS-induzierten Endotoxin-Schock gegenüber resistent waren. Im Bereich des endoplasmatischen Reticulums/cis-Golgi von Wildtyp-Zellen scheint MD-2 mit TLR4 zu assoziieren und zur Zelloberfläche zu wandern. Da TLR4 in MD-2-defizienten Zellen jedoch den Golgi-Apparat nachweislich nicht verlässt, ist MD-2 vermutlich für die intrazelluläre Distribution von TLR4 essentiell [Nagai et al, 2002].

Die Existenz des oben beschriebenen Rezeptor-Clusters (Abb. 3) könnte die Vielzahl der Signalkaskaden erklären, die durch LPS vermittelt werden. Dem Modell von Triantafilou & Triantafilou [2005] zufolge aktiviert der Molekül-Komplex die an der Produktion von TNFα und IL-1 beteiligten Regulatoren *nuclear factor* κB (NF-κB) und *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) und steht im Einklang mit Untersuchungen durch Schromm et al. [2000].

Unter Verwendung verschiedener LPS aus unterschiedlichen Organismen wurde zudem festgestellt, dass sowohl die Herkunft des LPS als auch seine molekulare Struktur die Interaktionen innerhalb des CD14/TLR4/MD2-Clusters sowie dessen Zusammensetzung

maßgeblich beeinflussen kann [Triantafilou et al., 2004]. Es scheint, dass die Erkennung pathogener Strukturen durch das angeborene Immunsystem weitaus vielfältiger und komplexer organisiert ist als bislang angenommen wurde, da die Protein-Zusammensetzung des *Signaling-Clusters* in Abhängigkeit des LPS individuell zu variieren scheint.

#### 4. Intrazelluläre Signalkaskaden nach LPS-Aktivierung

Nach der LPS-Aktivierung der Makrophagen erfolgt die Expression zahlreicher Gene, deren Regulation bislang nicht vollständig aufgeklärt ist. Verschiedene Signaltransduktionswege sind an diesem Netzwerk beteiligt, die in kurzer Form genannt werden sollen.

##### 4.1. Tyrosinkinasen

Die Aktivierung von Tyrosinkinasen ist ein schnelles Ereignis in LPS-stimulierten Makrophagen und führt zur Tyrosinphosphorylierung der *mitogen-activated protein* (MAP) Kinasen p38 und ERK 1/2 [Weinstein et al., 1991]. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die in Makrophagen nachgewiesenen Tyrosinkinasen Hck, Fgr und Lyn der Src-Familie<sup>9</sup> bei diesen frühen Phosphorylierungsreaktionen von entscheidender Bedeutung sind. Seit Experimenten mit Tyrosinkinase-*knockout*-Mäusen jedoch weiß man, dass ein Fehlen der Src-Kinasen den Ablauf von Signaltransduktionsprozessen in Makrophagen nicht beeinflusst [Meng & Lowell, 1997]. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor*  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aber nehmen Tyrosinkinasen vermutlich direkten Einfluss auf die Produktion pro-inflammatorischer Cytokine [Geng et al., 1993].

##### 4.2. Die klassischen MAP-Kinase-Wege

In phosphorylierter Form translozieren MAP-Kinasen in den Nukleus, wo sie verschiedene Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktivieren [Mitsubishi et al., 2003], die u.a. die genetische Regulation der Cytokinproduktion bei Entzündungsprozessen kontrollieren. Zuvor werden die MAP-Kinasen von MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK) phosphoryliert, die selbst durch MAPKK-Kinasen aktiviert werden (Tabelle 1).

---

<sup>9</sup> Src = *cellular proto-oncogenic homologue of the v-src oncogene of rous sarcoma virus*

**Tabelle 1: Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Weg**

Übersicht zur MAP-Kinase-Aktivierung über MAP-Kinase-Kinasen und MAP-Kinase-Kinase-Kinasen, die zu einer Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führen.

| MAP-Kinase-Kinase-Kinase             | MAP-Kinase-Kinase | MAP-Kinase |
|--------------------------------------|-------------------|------------|
| TAK1, MEKK1, MEKK2, MEKK3, TPL2, NIK | MEK1              | ERK1       |
|                                      | MKK3/6            | p38        |
|                                      | MKK4              | JNK/SAPK   |

Abkürzungen: TAK = *transforming growth factor- $\beta$  activated kinase*; MEK = *MAP-extracellular signal-regulated kinase*; MEKK = *MEK-kinase*; ERK = *extracellular signal-regulated kinase*; JNK = *cellular proto-oncogenic homologue of the v-jun oncogene of arenaviruses Junin (Jun) N-terminal kinase*; SAPK = *stress-activated protein kinase*; TPL = *tumor-progression locus*

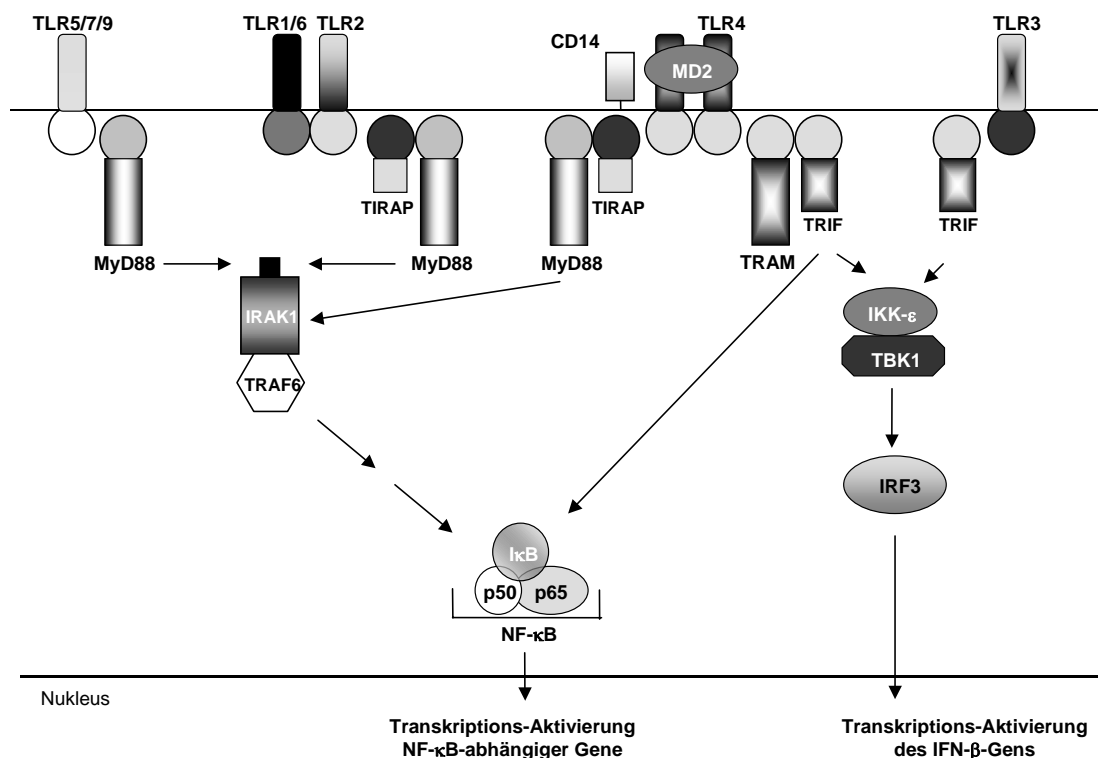
Die Phosphorylierung von MAP-Kinasen an benachbarten Serin- und Tyrosinresten durch MAPK-Kinasen erfolgt mittels eines von drei klassischen MAP-Kinase-Wegen [Karin & Hunter, 1995; Cobb & Goldsmith, 1995; DeFranco et al., 1998]. In Säugetieren sind 3 Familien von MAP-Kinasen mit verschiedenen Isoformen bekannt: *extracellular signal-regulated protein kinases* (ERK 1/2), *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases* (JNK 1/2) und *stress-activated protein kinases* (SAPK  $\alpha/\beta$ ) sowie die p38-MAP-Kinase (p38  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ) [Weston & Davis, 2002]. Die JNK-, SAPK- und p38-MAP-Kinasen sind durch Stress-Faktoren induzierbar. ERK 1/2 gilt als die klassische mitogen-aktivierbare Kinase.

#### 4.3. Intrazelluläre Signaltransduktion über das Adaptermolekül MyD88

Durch die in Abb. 3 beschriebene LPS/TLR4-Cluster-Bildung werden Adaptermoleküle verstärkt rekrutiert, die mit der TIR-Domäne von TLR4 interagieren. Das cytoplasmatische Adapterprotein *myeloid differentiation primary response protein* (MyD) 88 (35 kDa) lagert an den Rezeptorkomplex von TLR4 an, das Untersuchungen von Arch et al. [1998] zufolge für diese Interaktion als Oligomer vorliegen muss. Ein weiteres Adaptermolekül, MyD88 *adapter-like* (Mal) Protein, auch als *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP) bekannt, wurde durch Fitzgerald et al. [2001] bzw. Horng et al. [2001] beschrieben.

Der aktivierte TLR tritt nach Akira & Takeda [2004] mit MyD88 über zwei TIR-Domänen in Wechselwirkung (Abb. 4). Durch die Assoziation von MyD88 mit der Serin/Threonin-Kinase *IL-1R-associated kinase* (IRAK) 4 wird IRAK1 an letztere gebunden. Aminosäurereste im IRAK1-Kinase-Zentrum werden durch IRAK4 phosphoryliert und IRAK1 aktiviert, das daraufhin Reste im N-terminalen Bereich autophosphoryliert. Hierdurch wird die Bindung von *TNF-receptor-associated factor* (TRAF) 6 möglich. Der aus IRAK1 und TRAF6 bestehende Molekülverbund dissoziiert vom Rezeptorkomplex und interagiert mit einem Komplex aus *transforming growth factor* (TGF)  $\beta$ -*activated kinase* (TAK) 1, TAK-1-Bindeprotein (TAB) 1 und 2 an der Plasmamembran. Der TRAF6-TAK1-TAB1/2-Komplex gelangt in das Cytosol, wo die Assoziation mit den Ubiquitin-Ligasen *ubiquitin-conjugating enzyme* (UBC) 13 und *ubiquitin-conjugating enzyme 2 variant 1* (UEV1A) erfolgt. TAK1

wird hierdurch aktiviert und kann daraufhin MAP-Kinasen sowie den *inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B* (IKK)-Komplex aktivieren. IKK besteht aus einer regulatorischen Untereinheit (IKK $\gamma$ ) und den beiden homodimerisierenden, katalytischen Untereinheiten (IKK $\alpha$  und  $\beta$ ). Der NF- $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B, der die Kerntranslokationssequenz von NF- $\kappa$ B normalerweise maskiert [Miyamoto et al., 1994] wird durch den aktivierten IKK-Komplex an zwei Serinresten phosphoryliert, für eine Ubiquitinierung markiert und durch einen Proteasomenkomplex degradiert. Freies NF- $\kappa$ B gelangt mittels Translokation in den Nukleus, wo es die Expression zahlreicher Zielgene induziert (z.B. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6) [Karin & Delhase, 2000].



**Abb. 4: Adapterproteine mit einer TIR-Domäne und ihre Rolle in TLR-vermittelten Signalkaskaden**

Über die TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7 und 9 wird eine über MyD88 ablaufende Signalkaskade ausgelöst, die IRAK1 (IL-1R-associated kinase 1) sowie TRAF 6 (TNF-receptor-associated factor 6) aktiviert. Hierdurch werden MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen aktiviert, und es erfolgt die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus. Das Molekül TIRAP ist an der MyD88-abhängigen Signalkaskade ebenfalls beteiligt, aber nur über TLR2 und 4. Für eine über TLR 3- bzw. TLR4-induzierte MyD88-unabhängige Signalkaskade ist TRIF verantwortlich. TRIF führt über IKK- $\epsilon$  und TBK1 (TRAF-family-member associated NF- $\kappa$ B activator-binding kinase) zur Aktivierung von IRF3. Dieses Molekül induziert die Expression von IFN- $\beta$ -Genen. TRIF-related adaptor protein (TRAM) ist ein weiteres Adapter-Protein, das an der Aktivierung der MyD88-unabhängigen /TRIF-abhängigen Signalkaskade durch TLR4 beteiligt ist.

Abkürzungen: TLR = toll-like receptor, IRF = Interferon-regulierender Faktor; IFN = Interferon, TIR = Toll/interleukin-1-receptor, TRIF = TIR-domain-containing adapter protein inducing IFN- $\beta$ , TNF = Tumornekrosefaktor, TRAM = TRIF-related adapter molecule, TRAF = TNF-receptor-associated factor), IKK = inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B = nuclear factor  $\kappa$ B, MyD = myeloid differentiation primary response protein

[modifiziert nach Akira & Takeda, 2004]

Eine weitere Komponente des TLR-Signalkomplexes, die nur an der MyD88-abhängigen Signalkaskade über TLR2 und 4 involviert ist, ist das TIRAP. Durch Untersuchungen mit MyD88- bzw. TIRAP-defizienten Mäusen konnte die essentielle Bedeutung beider Moleküle für die TLR4-vermittelte Signaltransduktion gezeigt werden [Kawai et al., 1999; Horng et al., 2002]. MyD88 und TIRAP aktivieren sowohl den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B als auch MAP-Kinasen, im Falle von TIRAP jedoch nur über IRAK2 [Fitzgerald et al., 2001]. Eine mögliche Interaktion der beiden Moleküle konnte durch Immunopräzipitations-Studien bestätigt werden [Horng et al., 2001].

#### 4.4. MyD88-unabhängige intrazelluläre Signaltransduktion

Neben dem oben beschriebenen MyD88-abhängigen intrazellulären Signaltransduktionsweg sind womöglich weitere Adapterproteine mit einer TIR-Domäne in der Lage, Makrophagen unabhängig von MyD88 Signalkaskaden zu aktivieren [Akira & Takeda, 2004].

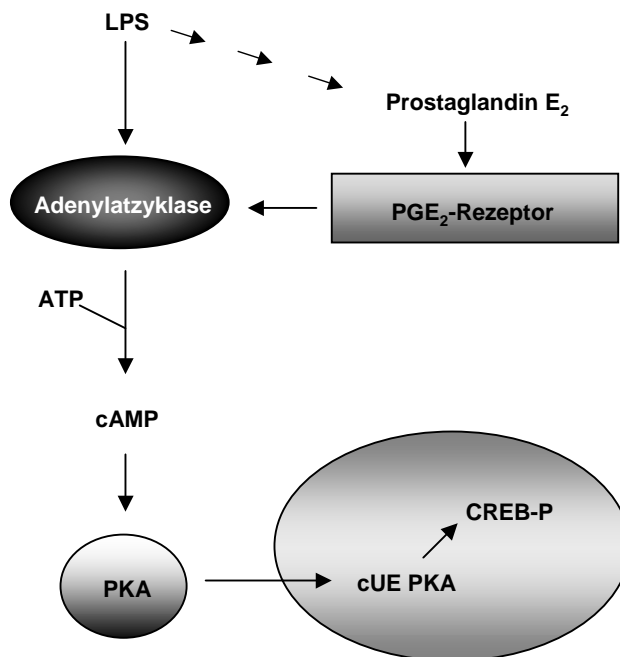
Ein solches Molekül ist das *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$*  (TRIF), das für die Aktivierung einer MyD88-unabhängigen Signalkaskade über TLR3 und 4 verantwortlich ist. An der TLR4-vermittelten Signaltransduktion ist neben TRIF das Adaptermolekül *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) beteiligt. Ziel des Signalweges über TRIF ist die Produktion von IFN- $\beta$ . Er führt über mehrere Schritte zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Interferon-regulierender Faktor (IRF)-3, der in den Nukleus transloziert, die Co-Aktivatoren CBP und evtl. p300 rekrutiert und die Transkription der IFN-Typ I-Gene induziert. Die C- und die N-terminalen Regionen von TRIF können unabhängig voneinander NF- $\kappa$ B-abhängige Promotoren aktivieren [Akira & Takeda, 2004].

Dass für die vollständige Induktion proinflammatorischer Cytokin-Gene über TLR4 sowohl MyD88-vermittelte als auch MyD88-unabhängige Signale notwendig sind, zeigten Untersuchungen mit TRIF-mutierten Mäusen [Akira & Takeda, 2004]. Sugiyama et al. [2004] beschreiben den TLR4-vermittelten LPS-Signalweg als einzigartig in seiner Fähigkeit, sowohl MyD88- als auch TRIF-abhängige Immunantworten zu aktivieren.

#### 4.5. Der cAMP-abhängige Proteinkinase-A-Weg

Die Bindung von LPS an einen Rezeptorkomplex zur Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase kann über zwei Wege erfolgen (Abb. 5): entweder vermittelt der Rezeptorkomplex selbst diese Aktivierung [Triantafyllou & Triantafyllou, 2002], oder die Aktivierung erfolgt über den Arachidonsäuremetaboliten Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub>. Dieser intrazelluläre Signalweg führt nach der Bindung von LPS zunächst zu einer Aktivierung von Tyrosinkinasen, die wiederum MAP-Kinasen aktivieren. Die cytosolische Phospholipase (cPL) A2 wird hierdurch phosphoryliert und katalysiert die Bildung von Arachidonsäure [Pyne et al., 1997]. Das Enzym Cyclooxygenase (COX) 2 wandelt die Arachidonsäure nach ihrer Freisetzung aus der Membran in PGE<sub>2</sub> um, das durch die Bindung an den PGE<sub>2</sub>-

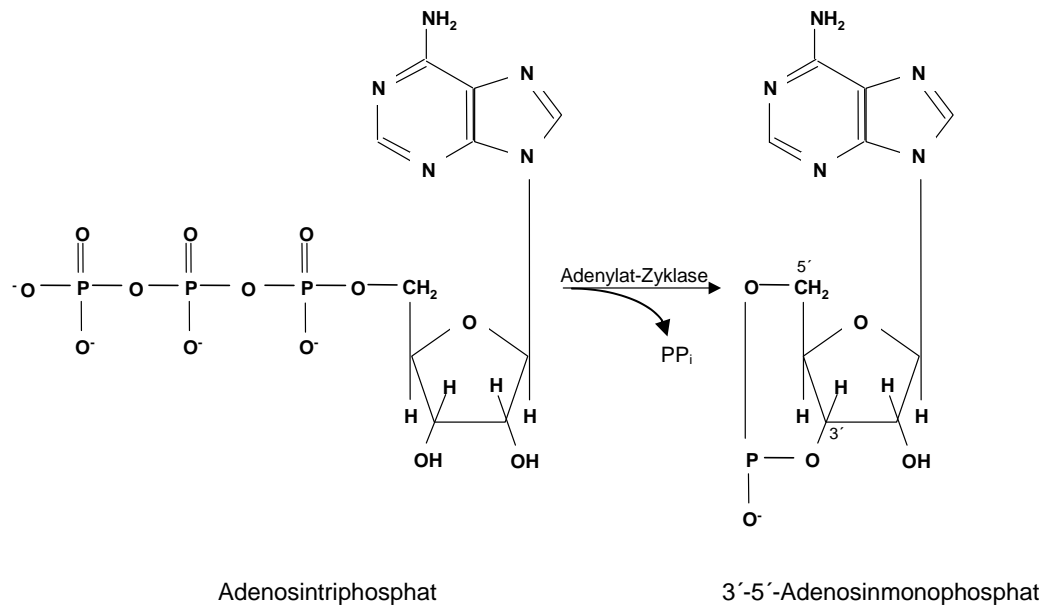
Rezeptor die Adenylatzyklase aktivieren kann [Maldve et al., 2000]. Durch die Zugabe von exogenem  $\text{PGE}_2$  erhöht sich folglich die intrazelluläre cAMP-Menge [Lazzeri et al., 2001].



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über Proteinkinase A**  
Erläuterungen siehe Text

Abkürzungen:  $\text{PGE}_2$  = Prostaglandin  $\text{E}_2$ ; cAMP=cyclisches Adenosinmonophosphat; PKA = Proteinkinase A; cUE PKA = katalytische Untereinheit der PKA; CREB = cAMP-response element binding protein

Sowohl bei der Rezeptor-vermittelten als auch der Arachidonsäure-abhängigen Aktivierung der Adenylatzyklase ist ein G-Protein beteiligt. Die Adenylatzyklase katalysiert die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zum cyclischen 3'-5'-Adenosinmonophosphat (cAMP; Abb. 6). Eine Erhöhung der Enzym-Aktivität führt zur verstärkten Synthese der intrazellulären cAMP-Menge. Die neun in Säugetieren bekannten Adenylatzyklase-Isoformen (I–IX) weisen eine Identität von 40-60% auf, unterliegen aber verschiedenen regulatorischen Mechanismen.



**Abb. 6: Katalytische Umwandlung von Adenosintri-phosphat (ATP) in cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase**

Die 1968 erstmals beschriebene cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) [Walsh et al., 1968] wird von cAMP allosterisch aktiviert und enthält in ihrer inaktiven Form zwei katalytische (k) und zwei regulatorische Untereinheiten (r). Die Dimerisierungsdomäne von PKA am N-terminalen Ende des Proteins besteht aus vier Helix-Strängen. Am C-Terminus jedes Protomers befinden sich zwei Tandem-cAMP-Bindedomänen (CBD-A und CBD-B), die hochkonserviert und sowohl in Bakterien als auch im Menschen zu finden sind [Canaves & Taylor, 2002]. Sie bestehen aus helikalen Subdomänen und einer acht-strängigen  $\beta$ -Faltblattstruktur, an die cAMP bindet [Kim et al., 2005]. Der PKA-Tetramerkomplex  $k_2r_2$  ist katalytisch inaktiv, da jede r-Untereinheit eine selbstinhibierende Domäne besitzt, die die Substratbindestelle einer k-Untereinheit blockiert. Sobald jedoch cAMP an die jeweilige Bindestelle der r-Untereinheit anlagert (je eine an jeder r-Untereinheit), ändert sich die Konformation der r-Strukturen und der  $k_2r_2$ -Komplex dissoziiert. Die freien, katalytisch aktiven k-Untereinheiten translozieren in den Nukleus, wo sie den Transkriptionsfaktor *cAMP-response element binding protein* (CREB, siehe Einleitung 6.1.) phosphorylieren [Karin & Hunter, 1995]. Durch die Phosphorylierung ändert sich die Konformation des Moleküls, CREB wird aktiviert und kann die Transkription verschiedener CREB-abhängiger Gene regulieren.

## 5. Potentielle Regulatoren des PKA-Weges

### 5.1. Phosphodiesterasen

Da eine erhöhte Produktion von cAMP eine verstärkte Expression zahlreicher Entzündungsmediatoren bewirkt, ist die kontrollierte Degradation von cAMP für den



Organismus nach einer Signalvermittlung von elementarer Bedeutung. Über mehrere Schritte wird cAMP daher durch Phosphodiesterasen (PDE) abgebaut. Diese Enzyme haben die der Adenylatzyklase entgegengesetzte Aufgabe, ATP aus cAMP zu generieren und dadurch die Aktivität der PKA zu regulieren. Die 10 Mitglieder der PDE-Familie werden in Gruppen unterteilt und ihre Mitglieder mit Nummern (1-10) gekennzeichnet. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren aber kann die PDE4 inhibiert werden, was eine Degradation des intrazellulären cAMPs verhindert. Der cAMP-Spiegel bleibt folglich erhöht [Teixeira et al., 1997] und führt zur verstärkten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und CREB. Jimenez et al. [2001] haben in humanen T-Zellen eine klare Korrelation zwischen der Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch exogenes dB-cAMP und der Inhibition des Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zeigen können.

Die Inhibition von PDEs ist aus medizinischer Sicht zur Verringerung der Produktion des proinflammatorischen Cytokins TNF $\alpha$  sehr interessant. Ferner haben Versuche zeigen können, dass die Erhöhung intrazellulären cAMPs die Akkumulation der TNF $\alpha$ -mRNA drastisch reduziert [Taffet et al., 1989].

## 5.2. Proteinphosphatasen

Wichtige Enzyme zahlreicher Signalkaskaden stellen die Proteinphosphatasen (PP) dar, die phosphorylierte Proteine dephosphorylieren und hierdurch die Wirkung von Protein-Kinasen aufheben. Die koordinierte und umkehrbare Wechselwirkung zwischen Serin/Threonin-Kinasen und -Phosphatasen stellt einen fundamentalen Mechanismus zahlreicher biologischer Prozesse dar. Das menschliche Genom codiert für deutlich mehr Protein-Kinasen als Protein-Phosphatasen. Die Phosphorylierung von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei zellulärer Signalweiterleitung und bei Genexpressionsvorgängen [Karin, 1994].

In Abhängigkeit der Aminosäure, die durch sie dephosphoryliert wird, unterscheidet man zwischen Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphatasen. In Säugetieren sind 4 verschiedene Serin/Threonin-Phosphatasen bekannt, die als PP1, 2A, 2B und 2C bezeichnet werden. Die PP 2C steht in keinem Zusammenhang mit den anderen Serin/Threonin-Phosphatasen, deren katalytische Untereinheiten in ihrer Sequenz identisch sind.

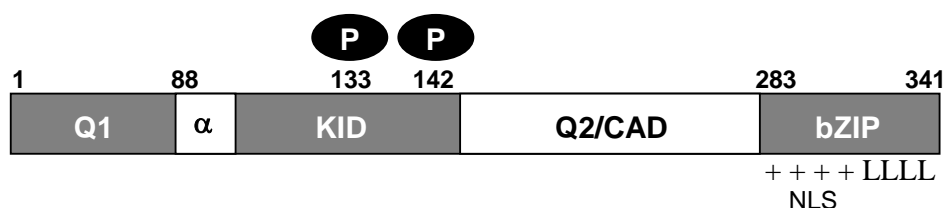
Hauptsächlich verantwortlich für die Umkehr zahlreicher Serin/Threoninkinase-vermittelter Phosphorylierungsreaktionen ist die Ca<sup>2+</sup>-abhängige PP2B, die als Calcineurin bezeichnet wird [Alberts et al., 1995; Krauss, 1997]. Zahlreiche Proteine werden durch die PP1 dephosphoryliert, darunter auch der durch die PKA phosphorylierte Transkriptionsfaktor CREB. Da die PP1 den aktiven Transkriptionsfaktor CREB dephosphorylieren und somit inaktivieren kann, stellt dieses Enzym möglicherweise einen Regulator der Produktion proinflammatorischer Cytokine dar.

## 6. Transkriptionsfaktoren

An der Bekämpfung pathogener Organismen durch das Immunsystem sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren beteiligt, die die Expression einer Vielzahl von Genen koordinieren. Im weiteren werden jedoch nur die Transkriptionsfaktoren näher betrachtet werden, die von Relevanz bei der LPS-induzierten Produktion der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  sind.

### 6.1. cAMP-response element-binding protein (CREB)

Von großem Interesse für die vorliegende Arbeit war der zur Familie der CREB/ATF-Moleküle zählende Transkriptionsfaktor *cAMP-response element binding protein* (CREB). Die weiteren Mitglieder der Familie sind *activating transcription factor* (ATF) 1 und *cAMP response element modulator* (CREM). Der dimerisierende Faktor CREB mit basischer Leucin-Zipper (bZIP)-Domäne (Abb. 7) liegt in inaktiver Form im Zellkern vor, wird aber durch eine katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) am Serin-Rest 133 phosphoryliert und aktiviert [Gonzales & Montminy, 1989].



**Abb. 7: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des CREB-Proteins**

Dargestellt sind die Domänen des CREB-Proteins sowie die Phosphorylierungsstellen an Serin 133 und Serin 142. Die Zahlen über der Abbildung geben die jeweilige Position der Aminosäure an. (+) markiert die positiv geladene basische Domäne und (L) die *Leucin-Zipper*-Domäne. Der Bereich des *nuclear localization signal* (NLS) ist ebenfalls angegeben.

Abkürzungen: KID = *kinase inducible domain*; Q1 = Glutamin-reiche Region am N-Terminus ; Q2/CAD = Glutamin-reiche Domäne (Peptide 165 bis 252) zur Anlagerung der Polymerase II-Transkriptionskomponenten

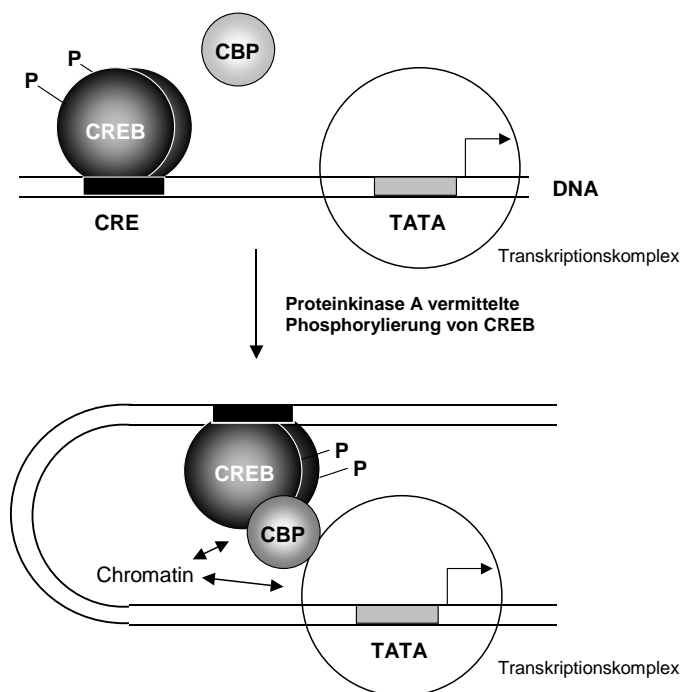
[modifiziert nach Shaywitz & Greenberg, 1999]

In aktivierter Form kann CREB als wichtiger Transkriptionsfaktor u.a. für die Expression der Gene für IL-1 $\beta$  und IL-6 fungieren [Auron & Webb, 1994; Karin & Hunter, 1995; Akira & Kishimoto, 1997]. Eine Phosphorylierung des Serinrestes 142 führt nach Shaywitz & Greenberg [1999] zu einer Inhibition der CREB-vermittelten Transkriptionsaktivität. In wieweit die beiden Serinreste 133 und 142 die transkriptionelle Aktivität von CREB positiv bzw. negativ regulieren ist bislang nicht bekannt.

Vermutlich erfolgt die transkriptionelle Aktivierung von CREB durch die Interaktion mit verschiedenen Dimerisierungspartnern. Der Transkriptionsfaktor kommt in zahlreichen Geweben vor, spielt aber eine wichtige regulatorische Rolle innerhalb des Nervensystems [Gonzales & Montminy, 1989; Sheng et al., 1991; Xing et al., 1996] wie auch bei der

Entwicklung von T-Zellen [Rudolph et al., 1998]. Es ist bekannt, dass CREB zudem bei Lernprozessen und der Entwicklung von Gedächtnis von Bedeutung ist [Tan et al., 1996; Deak et al., 1998; Guzowski & McGaugh, 1997]. Aktuelle Untersuchungen von Chen et al. [2005] gehen desweiteren von einer Beteiligung bei der Regulation der Muskelentwicklung während der Säugetier-Embryogenese aus. CRE-ähnliche Promotor-Sequenzen wurden in humanen T-Zellen sowohl in der Promotorregion des IL-1 $\beta$ - als auch des TNF $\alpha$ -Gens gefunden [Liu & Whisler, 1998].

Das CREB-Protein ist ein transkriptioneller Gen-Aktivator für Gene mit *cAMP-response element* (CRE)-Motiven im Promotorbereich [Lalli & Sassone-Corsi, 1994] wie z.B. das Cyclooxygenase (COX)-2-Gen [Chen et al., 2004]. CRE ist eine palindromische Octamer-DNA-Sequenz (TGACGTCA) [Yamamoto et al., 1988], die cAMP-regulierte Transkriptionsabläufe vermittelt. Wie Untersuchungen von Mayr et al. [2001] zeigten, kann der Faktor CREB hierbei zwischen cAMP-vermittelten und cAMP-unabhängigen Signalen unterscheiden und die Inhibition oder die Aktivierung der Expression von Ziel-Genen koordinieren. Der Co-Aktivator *CREB-binding protein* (CBP), ein nukleäres Protein der Größe 265 kDa, ist als Transkriptions-Adaptor zusätzlich für die CREB-vermittelte Transkription notwendig (Abb. 8). Es kann mit phosphoryliertem CREB aber nur über eine als KID-Interaktionsdomäne (KIX) bezeichnete Region am N-terminalen Ende interagieren [Chrivia et al., 1993].



**Abb. 8: Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB durch Phosphorylierung**

Das am Serin-Rest 133 phosphorylierte CREB-Protein bindet als Dimer an die korrespondierende CRE-Sequenz. Für eine effiziente Transkriptionsaktivierung benötigt CREB den Co-Aktivator CBP. Durch dessen Histon-Acetylase-Aktivität kommt es zur Chromatin-Umstrukturierung und zur Wechselwirkung mit dem Transkriptionskomplex.

Abkürzungen: CRE = *cAMP-response element*; CREB = *CRE-binding protein*; CBP = *CREB-binding protein*

[modifiziert nach Krauss, 2003]

Es wird angenommen, dass CREB-gebundenes CBP benachbarte Histone durch seine Histon-Acetylase-Aktivität [Shaywitz & Greenberg, 1999] acetyliert, die Chromatin-Struktur beeinflusst und die Interaktion zwischen CREB und den Komponenten des

Transkriptionskomplexes begünstigt, was zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität von CREB führt [Nakajima et al., 1996; Korzus et al., 1998].

Ein weiteres Protein, p300, ist CBP in vielerlei Hinsicht ähnlich und wurde lange als dessen Partnermolekül betrachtet. Untersuchungen in p300-defizienten Mäusen haben jedoch gezeigt, dass die Assoziation zwischen phosphoryliertem CREB und p300 für die CREB-Aktivität nicht erforderlich ist [Yao et al., 1998].

## 6.2. Nuclear factor $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

Für die Transkription des IL-1 $\beta$ -Gens ist NF- $\kappa$ B als nicht essentiell, aber als erforderlich für eine maximale Transkriptionsaktivität beschrieben worden [Auron & Webb, 1994]. Für die Expression der Gene für IL-6 und TNF $\alpha$  ist NF- $\kappa$ B ein wichtiger Transkriptionsfaktor [Shakhov et al., 1990; Akira & Kishimoto, 1997]. Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B (Rel)-Familie<sup>10</sup> in Säugetieren sind allgemein betrachtet essentiell wichtige Regulatoren von Entzündungsprozessen und der Immunantwort. Ursprünglich wurde NF- $\kappa$ B als *Enhancer*-DNA-Bindeprotein des  $\kappa$ -Immunglobulins entdeckt. Im Promotor- und *Enhancer*-Bereich zahlreicher bei Entzündungsprozessen exprimierter Gene ist das DNA-Bindemotiv für NF- $\kappa$ B zu finden [Bauerle & Baichwal, 1997]. Das Heterodimer p65-p50 ist die am häufigsten zu findende NF- $\kappa$ B-Kombination, doch können alle Mitglieder der Familie (p65, c-Rel, RelB, p50 und p52) homo- bzw. heterotypische Kombinationen ausbilden. Es dimerisieren *in vitro* aber nicht alle Moleküle gleichermaßen, und RelB-Homodimere konnten bislang nicht nachgewiesen werden.

Der funktionelle Aufbau der NF- $\kappa$ B-Moleküle scheint in hohem Maße konserviert zu sein. Die Rel-Domäne am N-terminalen Ende der Aminosäuresequenzen vermittelt die DNA-Protein-Bindung, wohingegen die C-terminale Region für die Dimerisierung der Moleküle verantwortlich ist [Natoli et al., 2005].

Der Hauptvorgang der NF- $\kappa$ B-Aktivierung findet im Cytoplasma statt. I $\kappa$ B, ein die Kerntranslokationssequenz von NF- $\kappa$ B blockierender Inhibitor, wird durch einen Proteasomenkomplex abgespalten, und freies NF- $\kappa$ B kann in den Nukleus translozieren und als Transkriptionsfaktor fungieren. Hierbei reicht die Degradation von I $\kappa$ B zwar für die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus aus, doch die Phosphorylierung der Untereinheit p65 verstärkt die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors [Schmitz et al., 2001; Vermeulen et al., 2002; Ghosh & Karin, 2002].

---

<sup>10</sup> cellular proto-oncogenic homologue of the v-rel oncogene of avian leukaemogenic reticuloendotheliosis retrovirus

### 6.3. Nuclear factor IL-6 (NF-IL6)

Wie bereits CREB zählt auch NF-IL6 zu den bZIP-Transkriptionsfaktoren, deren basischer Leucin-*Zipper* als DNA-Bindemotiv dient. Im Nukleus liegt NF-IL6 in inaktiver Form vor, wird nach einer Zellstimulierung aber durch eine Phosphorylierungsreaktion aktiviert. Der Faktor wurde zunächst als essentieller Aktivator des IL-6-Gens charakterisiert [Auron & Webb, 1994], ist für maximale Transkriptionsraten dieses Gens jedoch nach Untersuchungen durch Akira & Kishimoto [1997] nicht erforderlich. Von großer Bedeutung ist NF-IL6 jedoch für die Gentranskription der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  [Auron & Webb, 1994; Godambe et al., 1994].

### 6.4. Activator protein (AP-1)

Bindemotive für den Transkriptionsfaktor AP-1 finden sich in den Promotorregionen der Gene für IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  [Bensi et al., 1990; Rhoades et al., 1992; Akira & Kishimoto, 1997]. Das Dimer AP-1 besteht zumeist aus je einem Mitglied der Familie der Jun<sup>11</sup>-, bzw. der Fos<sup>12</sup>-Proteine, doch kommt es in seltenen Fällen zur Ausbildung weniger stabiler Homodimere.

### 6.5. Purine-rich motif transcriptionfactor (PU.1)

PU.1 wird in Makrophagen, B-Zellen, Neutrophilen, Mastzellen und hämatopoetischen Stammzellen konstitutiv exprimiert und kontrolliert in vielen Fällen die Gentranskription mittels Interaktion mit weiteren regulatorischen Faktoren. In Makrophagen wird PU.1 neben anderen Faktoren als erforderlich für eine effiziente Transkription des IL-1 $\beta$ -Gens beschrieben [Buras et al., 1994; Kominato et al., 1995]. In Folge einer LPS-Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor PU.1 an Serin-Resten phosphoryliert und hierdurch aktiviert. Zudem ändert sich die Konformation des Moleküls innerhalb der N-terminalen Domäne.

## 7. Die proinflammatorischen Cytokine

Proinflammatorische Cytokine sind von Immunzellen sezernierte Signalmoleküle und regulieren als endogene Pyrogene<sup>13</sup> zahlreiche Funktionen des Immunsystems. Durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf den Oberflächen ihrer Zielzellen erfolgt die Cytokin-vermittelte Signaltransduktion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Regulation von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  von besonderer Relevanz. Daher werden diese Cytokine im folgenden näher betrachtet.

---

<sup>11</sup> cellular proto-oncogenic homologue of the v-jun oncogene of arenavirus Junin

<sup>12</sup> cellular proto-oncogenic homologue of the v-fos oncogene of Finkel-Biskis-Jenkins murine osteosarcoma virus

<sup>13</sup> Pyrogen = Fieber-induzierend

## 7.1. Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Interleukin (IL)-1 $\beta$  (17 kDa) ist ein entzündungsförderndes Cytokin, das hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Monocyten, Fibroblasten, Keratinocyten und B-Zellen [Telford et al., 1986] produziert wird. Bei der Synthese von IL-1 $\beta$  wird zunächst ein ca. 31 bis 35 kDa großes, cytoplasmatisches Vorläufermolekül, das Pro-IL-1 $\beta$ , gebildet. Die Caspase 1, die zu einer Familie von Cysteinproteasen gehört und auch als *IL-1 $\beta$  converting enzyme* (ICE) bezeichnet wird, ist an der nachfolgenden Prozessierung des reifen IL-1 $\beta$ -Moleküls (17 kDa) beteiligt. Im Gegensatz zu anderen Caspasen, deren Beteiligung an apoptotischen Prozessen nachgewiesen wurde [Hale et al., 1996; Nicholson & Thornberry, 1997] besitzt die Caspase 1 selbst keinen Einfluss auf die Apoptose<sup>14</sup>. An der Regulation der ICE-Aktivität scheint der LPS- und IFN- $\gamma$ -induzierbare Janus-Kinase 3 (JAK3)-Signalweg beteiligt zu sein. Kim et al. [2004] berichten von einer verstärkten LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion in JAK3-*knockout*-Mäusen. Da das IL-1 $\beta$ -Molekül keine hydrophobe Signalsequenz besitzt [Auron & Webb, 1994], die für gewöhnlich den Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche reguliert, sind in der Literatur verschiedene Möglichkeiten der IL-1 $\beta$ -Proteinsekretion postuliert worden:

- über ein bislang nicht näher definiertes, vom ER-Golgi-Weg unabhängiges Transportsystem [Rubartelli et al., 1990]
- durch Mikrozerstörungen in der Zellmembran [Jessop & Hoffman, 1993]
- durch Auslösung einer Apoptose [Hogquist et al., 1991]
- durch Beschädigung der Zelle mit toxischen Substanzen [Rubartelli et al., 1993; Griffiths et al., 1995]

Der Promotorbereich des IL-1 $\beta$ -Gens enthält eine Reihe regulatorischer Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren CREB, NF- $\kappa$ B/Rel, AP-1 und NF-IL6, deren Bindung und Funktion durch LPS beeinflusst wird [Jeon et al., 2000]. Die Mitglieder der IL-1-Familie zeichnen sich durch eine ähnliche  $\beta$ -Faltblattstruktur aus 12  $\beta$ -Faltblättern aus [Bufler et al., 2004]. IL-1 $\beta$  beeinflusst u.a. das im Hypothalamus befindliche Zentrum der Thermoregulation des Körpers [Klein, 1991]. In hoher Dosis kann es daher zu hohem Fieber und einer starken Entzündung von Geweben führen. Der Zielorte von IL-1 $\beta$  sind u.a. T-Zellen und Makrophagen, die zur Sezernierung weiterer Vermittlermoleküle angeregt werden.

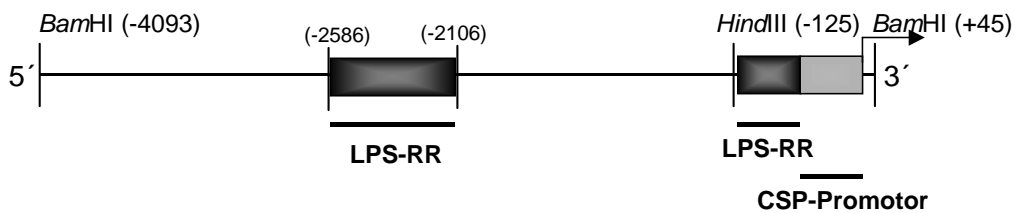
### 7.1.1. LPS-induzierbare *cis-acting* Elemente im IL-1 $\beta$ -Gen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von LPS auf die Induktion der IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität untersucht. Die nachfolgenden Abbildungen stellen die bisher für das IL-1 $\beta$ -Gen beschriebenen *cis-acting* Elemente stromaufwärts des Transkriptionsstarts dar, die eine essentielle Rolle bei der LPS-vermittelten Induktion der IL-1 $\beta$ -Produktion spielen sowie für maximale Transkriptionsraten notwendig sind. Im folgenden sind die entsprechenden

---

<sup>14</sup> Apoptose = programmierter Zelltod

Bereiche des murinen als auch des humanen IL-1 $\beta$ -Gens dargestellt. Das IL-1 $\beta$ -Gen der Maus (GenBank *accession number* U03987; Position -4093 bis -1) enthält an den Positionen -2586 bis -2106 bzw. -100 bis -50 zwei LPS *responsive regions* (LPS-induzierbarer *Enhancer*-Bereiche) als entsprechende *cis-acting* Elemente für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (Abb. 9). Ein minimaler Promotor, als *cap-site proximal* (CSP)-Promotor bezeichnet, befindet sich an Position -49 bis -1 [Godambe et al., 1995].



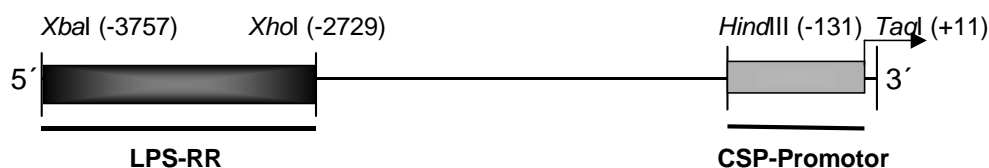
**Abb. 9: LPS-induzierbarer *Enhancer*- und Promotorbereich des murinen IL-1 $\beta$ -Gens**

Schematische Darstellung der bislang bekannten LPS-induzierbaren Elemente des murinen IL-1 $\beta$ -Gens, die für die LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  sowie maximale Transkriptionsraten von Bedeutung sind. Die Zahlen innerhalb der Klammern geben die Position der Basenpaare stromaufwärts (-) bzw. stromabwärts (+) vom Transkriptionsstart (durch einen Pfeil markiert) an.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; LPS-RR = LPS-*responsive region* (schwarz); CSP-Promotor = *cap-site proximal promoter* (grau)

[modifiziert nach Schilling, 2000]

Das humane IL-1 $\beta$ -Gen (GenBank *accession number* U26540 und X04500; Position -3757 bis -1) hingegen beinhaltet an Position -3757 bis -2729 als *cis-acting* Element nur eine, dafür im Vergleich zum murinen IL-1 $\beta$ -Gen deutlich längere LPS *responsive region* (Abb. 10). Der minimale CSP-Promotor ist zudem im humanen Gen einige Basenpaare länger (Position -131 bis -1) [Shirakawa et al., 1993].



**Abb. 10: LPS-induzierbarer *Enhancer*- und Promotorbereich des humanen IL-1 $\beta$ -Gens**

Schematische Darstellung der bislang beschriebenen LPS-induzierbaren Elemente des humanen IL-1 $\beta$ -Gens stromaufwärts vom Transkriptionsstart, die von essentieller Bedeutung für die LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  sowie für maximale Transkriptionsraten sind. Die Zahlen innerhalb der Klammern geben die Position der Basenpaare stromaufwärts (-) bzw. stromabwärts (+) vom Transkriptionsstart (durch einen Pfeil markiert) an.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; LPS-RR = LPS-*responsive region* (schwarz); CSP-Promotor = *cap-site proximal promoter* (grau)

[modifiziert nach Schilling, 2000]

Nach Untersuchungen durch Shirakawa et al. [1993] und Buras et al. [1994] geht man heute davon aus, dass die LPS-induzierte transkriptionelle Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion trotz der Unterschiede der Genelemente im murinen und humanen System vergleichbar ist.

## 7.2. Interleukin-6 (IL-6)

Der Promotor des IL-6-Gens enthält regulatorische Elemente zur Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB und C/EBP [Hershko et al., 2002]. Zielzellen des pleiotrophen Cytokins, das sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt [Barton et al., 1996; Papanicolaou et al., 1998; Xing et al., 1998], sind u.a. Hepatocyten, die zur Produktion von Akutphasen-Proteinen angeregt werden sowie B-Zellen, die IL-6 in der späten Phase der Proliferation als Wachstumsfaktor benötigen [Abbas et al., 1997]. Die Sezernierung des 26 kDa-Proteins erfolgt durch mononukleäre Phagocyten, Makrophagen, aber auch durch Endothelzellen der Gewebe sowie Fibroblasten. Durch die Bindung an seinen Rezeptor, der aus Bindeprotein und Signal-übertragender Untereinheit besteht, wirkt IL-6 auf seine Zielzellen ein.

## 7.3. Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

TNF $\alpha$ , ein pleiotrophes<sup>15</sup> Cytokin, das vorwiegend von aktivierten mononukleären Phagocyten (Makrophagen, Monocyten), aber auch durch Mastzellen, stimulierte T-Zellen oder natürliche Killerzellen [Klein, 1991; Abbas et al., 1997] produziert wird, beeinflusst neben IL-1 $\beta$  eine Vielzahl von Zellen und gilt als prinzipieller Vermittler von Immunreaktionen. Erstmals wurde TNF $\alpha$  im Serum LPS-behandelter Tiere entdeckt, wo es *in vivo* Tumornekrosen verursachte [Old, 1988].

Die TNF $\alpha$ -Synthese in mononukleären Phagocyten beginnt mit der Bildung nicht-glykosylierter Membranproteine (Typ II, 25 kDa) mit extrazellulärem, C-terminalem und intrazellulärem, N-terminalem Ende [Abbas et al., 2000]. Über eine Verknüpfung ihrer Carboxyltermini assoziieren drei Monomere in der Membran. Nach der proteolytischen Abspaltung eines 17 kDa-Fragments von jeder Untereinheit durch eine membranständige Metalloproteinase entsteht ein stabiles Homotrimer (51 kDa), das von den Zellen sezerniert wird [Aggarwal et al., 1985]. Die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B *nuclear factor of activated T cells* (NF-AT), AP-1, CREB und *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-1 werden als bedeutsam für die Genexpression von TNF $\alpha$  beschrieben (s. Transkriptionsfaktoren) [Collart et al., 1990; Csonga et al., 1998]. Das Protein kann durch seine Zielzellen mittels zweier Rezeptoren gebunden werden: TNF-Rezeptor (TNF-R) I und II, wobei TNF-RI eine größere Bedeutung bei der Immunabwehr zugerechnet wird.

---

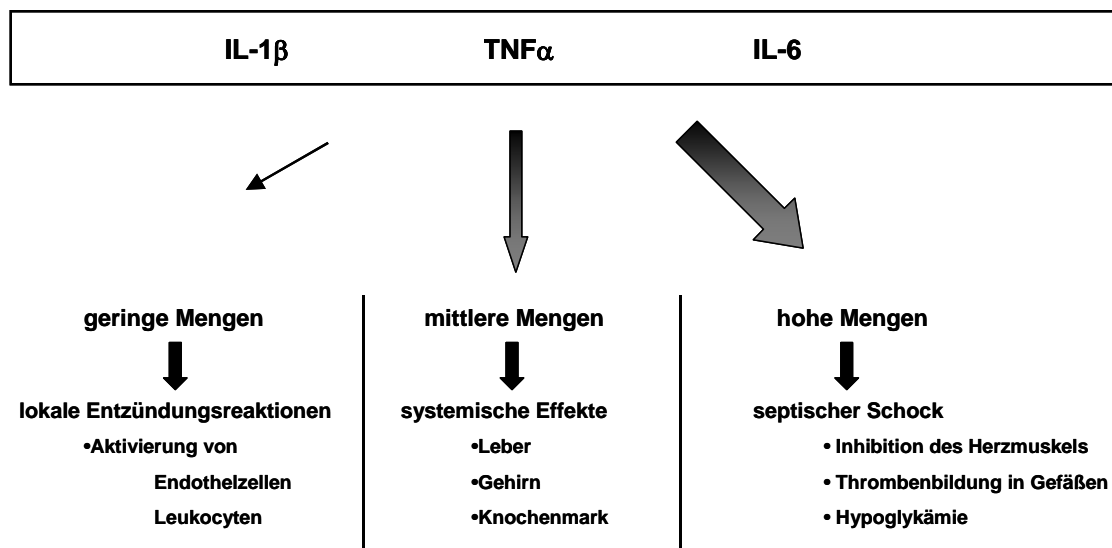
<sup>15</sup> gr.: „pleion“ = mehr, mit vielfältigen Wirkungen



#### 7.4. Die Effekte proinflammatorischer Cytokine *in vivo*

IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stehen in engem Zusammenhang mit Elementen der Akut-Phase-Immunantwort. Zusammen mit TNF $\alpha$  ist IL-1 $\beta$  verantwortlich für LPS-vermitteltes Fieber [Saigusa, 1990; Luheshi et al., 1997]. Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) sind mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Cytokine verbunden. Baranzini et al. [2002] haben gezeigt, dass die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Gehirnproben von Patienten mit MS drastisch erhöht ist. Diese Cytokine können direkt selbst Oligodendrocyten verletzen und die Myelinscheiden zerstören [Carrieri et al., 1992] oder auch T-Zellen aktivieren, was zu einer zusätzlichen Schädigung der Myelinschicht führt [Martino et al., 1998].

In Abhängigkeit der produzierten Cytokinmenge sind die durch Cytokine vermittelten Effekte verschieden (Abb. 11). Geringe Mengen führen zu lokalen Entzündungsreaktionen, in deren Verlauf Endothelzellen und Leukocyten aktiviert werden. Systemische Effekte werden durch die Freisetzung mittlerer Cytokinmengen in den Blutstrom ausgelöst. Die Produktion hoher Mengen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  kann zu septischem Schock führen, wobei es durch die Inhibition des Herzmuskels neben weiteren lebensbedrohlichen Effekten zum Tod kommen kann.



**Abb. 11.: Effekte der proinflammatorischen Cytokine**

Makrophagen werden bei einer bakteriellen Infektion z.B. durch LPS aktiviert und produzieren proinflammatorische Cytokine. Diese Substanzen führen in moderaten Mengen zu zentral begrenzten Entzündungsreaktionen, können aber in mittleren oder hohen Dosen durch ihre Verteilung im Blutkreislauf zu systemischen Effekten bzw. zu septischem Schock mit Todesfolge führen.

[modifiziert nach Abbas et al., 1987]

Die Konzentration der produzierten Cytokine ist daher von entscheidender Bedeutung für die durch sie im Organismus ausgelösten Effekte.

Die Wirkung proinflammatorischer Mediatoren ist sehr vielfältig. Wie auch das Pyrogen IL-1 $\beta$  reguliert TNF $\alpha$  im Gehirn die Produktion Fieber-induzierender Prostaglandine durch

Hypothalamuszellen [Klein, 1991].  $\text{TNF}\alpha$  kann autokrin<sup>16</sup> oder parakrin<sup>17</sup> auf Makrophagen einwirken und diese zur Synthese weiterer Cytokine anregen oder B- und T-Lymphocyten aktivieren. Zudem sind bestimmte Typen bösartiger Tumore  $\text{TNF}\alpha$ -sensitiv [Senzer et al., 2004; Mueller, 1998]. Verschiedene Studien belegen darüber hinaus, dass auch Depressionen mit erhöhten Konzentration von IL-1 $\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  im ZNS verbunden sind [Connor & Leonard, 1998].

IL-1 $\beta$  ist ein wichtiger Aktivator von T-Lymphocyten und regt deren Proliferation an. Von großer Bedeutung ist IL-1 $\beta$  zudem bei der Reifung von B-Zellen. Daneben benötigen reife B-Zellen dieses Cytokin, um nach Kontakt mit einem Antigen zu Antikörper-produzierenden Zellen zu proliferieren. Proinflammatorische Cytokine sind somit von zentraler Bedeutung für die interzelluläre Kommunikation innerhalb des Immunsystems und übernehmen eine Vielzahl von Funktionen, ohne die eine erfolgreiche Immunabwehr nicht denkbar wäre.

## 8. Die LPS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid

Bislang wurden drei Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) charakterisiert [Michel et al., 1995]. Die endotheliale NOS (eNOS oder NOSIII) sowie die neuronale NOS (nNOS oder NOSI) werden auch als *constitutively expressed* NOS (cNOS) bezeichnet und sind zudem in ihrer enzymatischen Aktivität  $\text{Ca}^{2+}$ -reguliert. Alle in Säugetieren bekannten NOS sind als Homodimere aktiv [MacMicking et al., 1997].

Stickstoffmonoxid (NO) wird nach dem Kontakt zwischen Zelle und aktivierendem Agens erst nach einiger Zeit produziert. Moderate Mengen, die keine Gefährdung für den Organismus darstellen, werden durch die cNOS-Enzyme produziert. Die durch Cytokine und Endotoxine induzierbare NOS (iNOS oder NOSII) ist verantwortlich für die Produktion großer Mengen Stickstoffmonoxids [Xie et al., 1992; 1993] in Fibroblasten, Makrophagen, Hepatocyten, Zellen der glatten Muskulatur und in einigen Tumorzellen. Neben anderen reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $\text{NO}_3^-$  oder radikalischem Hydroxid ( $\text{OH}^\bullet$ ) ist NO an intrazellulären Regulationsvorgängen zur Expression von Cytokinen beteiligt [Ryan et al., 2004; Foley & O'Farrell, 2003; Forman et al., 2002; Remick et al., 1996] und spielt eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie von Schlaganfällen und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen [Pahan et al., 1998].

### 8.1. Die Regulation der induzierbaren NO-Synthase

Aus therapeutischer Sicht sind Erkenntnisse über die Regulation der iNOS von großer Bedeutung. Die Regulation der NO-Produktion erfolgt primär auf transkriptioneller Ebene [Xie et al., 1993], kann aber auch durch weitere Vorgänge wie alternatives *Splicing* [Eissa et al., 1998], mRNA-Stabilisierung [Vodovotz et al., 1993], Enzym-Dimerisierung [Ratovitski et

---

<sup>16</sup> auf die Zelle einwirkend, von der es produziert wurde

<sup>17</sup> auf Nachbarzellen einwirkend

al., 1999] und Substrat- und Co-Faktor-Verfügbarkeit [Kilbourn & Griffith, 1992] reguliert werden. Die LPS-vermittelte Induktion der NO-Produktion durch iNOS [Alley et al., 1994] ist abhängig von Interferon (IFN)- $\alpha\beta$ , das als autokriner/parokriner Mediator der NO-Produktion in murinen Makrophagen gilt. Werden die Zellen mit LPS stimuliert, so kommt es zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und IRF-1. Deren Aktivierung ist konsistent zur IFN- $\beta$ -Expression. LPS allein führt nicht zur maximalen iNOS-Induktion. Durch die Zugabe spezifischer Cytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und exogenem IFN- $\beta$  [Ganster & Geller, 2000] kann die LPS-induzierte iNOS-Aktivität gesteigert werden, da die Promotorregion der murinen iNOS Bindemotive für verschiedene Cytokin-induzierte Transkriptionsfaktoren enthält [Lowenstein et al., 1993]. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wurde durch Xie et al. [1994] für die maximale Expression der iNOS als essentiell beschrieben. Hierbei ist die Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 womöglich von zentraler Bedeutung, da sie für die Aktivitätssteigerung von NF- $\kappa$ B in LPS-stimulierten Zellen verantwortlich zu sein scheint, die eine Erhöhung von iNOS-Aktivität und NO-Produktion zur Folge hat [Chantôme et al., 2004].

Sowohl Typ I (IFN- $\alpha\beta$ )- als auch Typ II (IFN- $\gamma$ )-Interferone führen über die Aktivierung des Janus-Kinase (JAK)-STAT-Signalweges [Stark et al., 1998] zu einer Induktion der Zielgene. STAT-Proteine stellen eine Familie von Transkriptionsaktivatoren dar, die mit IFN-Rezeptoren und JAK-Proteinen interagieren und durch Phosphorylierung aktiviert werden. Es wird angenommen, dass STAT-1 als Vermittlermolekül zwischen IFN- und LPS-induzierter iNOS-Aktivierung in murinen Makrophagen fungiert [Kovarik et al., 1998]. In Gegenwart von LPS verstärkt und potenziert IFN- $\beta$  die Induktion der iNOS. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B wird für die Induktion der iNOS in LPS-aktivierten RAW 264.7 Makrophagen von Griscavage et al. [1996] als essentiell beschrieben.

## 8.2. Biologische Effekte von Stickstoffmonoxid

Aktivierte Makrophagen produzieren das freie, radikalische Gas Stickstoffmonoxid (NO), das an der Immunreaktion gegen pathogene Mikroben und Tumorzellen beteiligt ist. Hinsichtlich seiner Wirkorte ist es wie die proinflammatorischen Cytokine auch multifunktionell und an zahlreichen regulatorischen Prozessen und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Nerven-, Immun- und Kardiovaskularsystem werden in entscheidendem Maße durch NO reguliert. Neben anderen Effekten kann das sowohl cytotoxische als auch regulatorisch wirksame Molekül Bluthochdruck und septischen Schock verursachen [Bredt & Snyder, 1994] sowie die mitochondriale Atmung toxisch beeinflussen. NO beeinträchtigt die DNA-Neusynthese in Zielzellen sowie die Funktion der Aconitase (ein Enzym des Citratzyklus). Außerdem werden Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern (z.B. Ferredoxin, Nitrogenase, Glutamat-Synthase) [Gottschalk, 1986] durch NO in ihrer Aktivität beeinflusst.

NO ist das Produkt einer durch das Enzym NOS katalysierten 5-Elektronen-Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin, das positive und negative Effekte auf Zielzellen haben kann [Nathan, 1992] sowie als Effektormolekül der anti-viralen Immunantwort gilt [Croen, 1993; Mannick,

1995]. Makrophagen produzieren nach ihrer Aktivierung neben anderen Molekülen auch NO, um Tumorzellen zu bekämpfen und bakteriellen Infektionen entgegenzuwirken. Die LPS-induzierte Bildung von NO kann zur nachfolgenden Produktion von reaktiven Sauerstoff-/Stickstoff-Verbindungen wie Nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ), Nitroxyl ( $\text{NO}^-$ )-Ionen, Stickstoff-Dioxid ( $\text{NO}_2$ ), Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) und S-Nitrosothiol führen [Stamler et al., 1992].

### 8.3. Der *oxidative burst*

Neben NO existieren weitere reaktive Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen, die die intrazellulären Signalwege in Makrophagen beeinflussen können. Durch Babior et al. [1973] wurde zum ersten Mal die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten durch stimulierte Phagocyten erwähnt. Das Enzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-reduzierte (NADPH)-Oxidase ist verantwortlich für die als *oxidative burst* bezeichnete Produktion von Wasserstoffperoxid und weiteren reaktiven Molekülen in Folge einer Zellstimulierung. Sie werden mittlerweile in vielen Zellen als essentielle Bestandteile der normalen physiologischen Vorgänge betrachtet [Finkel, 1999; Thannickal & Fanburg, 2000].

## II. Problemstellung

Makrophagen nehmen im Immunsystem eine elementare Rolle als Schlüsselregulatoren ein. Durch die Interaktion zwischen dem LPS Gram-negativer Bakterien und Makrophagen wird der Makrophage aktiviert und zur Produktion entzündungsvermittelnder, biologisch aktiver Substanzen angeregt, die die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems vermitteln. Zu diesen Mediatoren zählen neben Lipiden und reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen auch die proinflammatorischen Cytokine, Hormonproteine, die sowohl auf auto- als auch auf parakrinem Wege die Effektivität des Immunsystems verstärken können.

Regulation und Produktion einiger proinflammatorischer Cytokine sind jedoch bei vielen Autoimmunkrankheiten gestört (z.B. rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ I) und führen zu irreversiblen Gewebeschädigungen. Für die Behandlung dieser Krankheiten und die Entwicklung geeigneter Therapeutika zur Modifizierung der Cytokinsynthese ist es von zentraler Bedeutung, zunächst die regulatorischen Mechanismen der Cytokinproduktion eingehender zu verstehen. Trotz intensiver Forschungstätigkeit in diesem medizinisch hoch relevanten Gebiet ist das regulatorische Netzwerk der Cytokinproduktion noch nicht lückenlos entschlüsselt.

Aus diesem Grund beschäftigt sich die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Nixdorff seit einigen Jahren mit der Regulation der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6. Makrophagen werden *in vitro* mit dem Oberflächenmolekül LPS aktiviert und die Abläufe der Cytokinproduktionen verfolgt. Durch Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt gewesen, dass die Regulation der Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 differenziert voneinander abläuft. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die negative Regulation der LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion durch die Zugabe des allgemeinen Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin aufgehoben wird und sowohl Proteinsynthese, mRNA-Akkumulation als auch die Promotor-Aktivität des IL-1 $\beta$ -Gens hierdurch deutlich verstärkt werden [Schilling, 2000; Schilling et al., 2001].

Da die negative Regulation von IL-1 $\beta$  durch die Wirkung von Staurosporin aufgehoben wurde, war es von besonderem Interesse, den Zielort (das *Target*) dieser Wirkung zu identifizieren. Dies hat sich jedoch als besonders schwierig herausgestellt, da Staurosporin offenbar sehr unspezifische Wirkungen haben kann [Schilling, 2000]. Um näheres über die Mechanismen der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  zu erfahren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine weitere Strategie verfolgt. Ausgehend von potentiellen Signalwegen, die zur Bildung von IL-1 $\beta$  führen, sollten Möglichkeiten zur Kontrolle der Produktion über diese Signalwege gesucht werden.

In der Literatur fanden sich Hinweise, dass der *second messenger* cAMP einen dem Staurosporin ähnlichen Effekt auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in anderen Systemen ausübt [Ohmori et al., 1990; Auron & Webb, 1994; Iwahashi et al., 2000]. Aus diesem

Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob die negative Kontrolle auf IL-1 $\beta$  durch Komponenten in diesem cAMP-abhängigen PKA-Weg ausgeübt werden könnte. Phosphodiesterasen (PDE) sind für die Degradation von intrazellulärem cAMP verantwortlich, und das PDE4-Mitglied der Familie ist in Makrophagen vorhanden. Inhibitoren von PDE sind allgemein dafür bekannt, dass sie zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegel führen [Cheng et al., 1997; Goncalves de Moraes et al., 1998]. Durch den Einsatz von Rolipram (4-(3'-Cyclopentyloxy-4'-methoxyphenyl)-2-pyrrolidon) sollte die enzymatische Aktivität von PDE4 spezifisch inhibiert werden, um einen möglichen Einfluss auf die Regulation von IL-1 $\beta$  untersuchen zu können. Im Falle von IL-1 $\beta$  wurden diese Untersuchungen hinsichtlich der Proteinproduktion und der mRNA-Akkumulation in Zeitkinetik-Experimenten sowie auf Ebene der Promotor-Aktivität durchgeführt.

Der für die Genaktivierung von IL-1 $\beta$  essentielle Transkriptionsfaktor *cAMP-response element-binding protein* (CREB) [Auron & Webb, 1994] ist nur in phosphorylierter Form aktiv. Es ist bekannt, dass das Enzym Proteinphosphatase (PP) 1 CREB dephosphorylieren kann [MacKintosh & Klumpp, 1990]. Um festzustellen, ob an der Regulation von IL-1 $\beta$  die PP1 in entscheidendem Maße beteiligt ist, sollte das Enzym durch Tautomycin spezifisch inhibiert werden. Wie in den mit Rolipram durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -Proteinproduktion und die mRNA-Akkumulation in zeitkinetischen Studien sowie die Promotor-Aktivität untersucht.

In Western-Analysen und Reportergenassays wurde des weiteren überprüft, ob eine Korrelation zwischen der Zugabe des PDE4- bzw. PP1-Inhibitors und dem Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors CREB besteht.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte die Wirkung dieser Inhibitoren auf die TNF $\alpha$ -, IL-6- und NO-Produktion untersucht werden, da vermutet wurde, dass die PDE4 und die PP1 unterschiedliche Wirkungen als bei der IL-1 $\beta$ -Produktion haben könnten.

### III. Material & Methoden

#### 1. Chemikalien

|   |  |
|---|--|
| 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid (37,5:1)      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Adenosintriphosphat (ATP)                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Agarose   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS)                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Ampicillin                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Avidinperoxidase                                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Bacto-Agar                                      | E. Merck AG, Darmstadt                           |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Bromphenolblau                                  | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg           |
| Calciumchlorid                                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Casein, Pepton                                  | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege                   |
| Chloroform                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Dextransulfat                                   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| di-buturyl-cAMP (dB-cAMP)                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                         | E. Merck AG, Darmstadt                           |
| di-Natriumcarbonat                              | E. Merck AG, Darmstadt                           |
| Di-Natriumhydrogenphosphat                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Dithiothreitol (DTT)                            | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege                   |
| Eisessig  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Ethylenguanintetraacetat (EGTA)                 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Essigsäure                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Ethanol   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Ethidiumbromid                                  | E. Merck AG, Darmstadt                           |
| Fötale Kälberserum (FCS)                        | Perbio Science GmbH, Bonn                        |
| Formaldehyd                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Formamid  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Glucose   | E. Merck AG, Darmstadt                           |
| Glutamin  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Glycerin  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Glycylglycin                                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Guanidiniumrhodanid                             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Hefeextrakt                                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| HPLC-Wasser                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Isopropanol                                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                        |
| Isoamylalkohol                                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Kaliumchlorid                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Kaliumhydrogenphosphat                          | E. Merck AG, Darmstadt                           |
| Kodak GBX Entwickler                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Kodak GBX Fixierer                              | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Luciferin                                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen           |
| Magermilchpulver                                | J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Obergrünzburg |
| Magnesiumchlorid                                | E. Merck AG, Darmstadt                           |

|  |  |
|--|--|
| Magnesiumsulfat                        | E. Merck AG, Darmstadt                 |
| Maleinsäure                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Methanol                               | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| 3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)    | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| $\beta$ -Mercaptoethanol               | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Naphtylendiamindihydrochlorid          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Natriumacetat                          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Natriumazid                            | E. Merck AG, Darmstadt                 |
| Natriumchlorid                         | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Natriumcitrat                          | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Natriumhydrogencarbonat                | E. Merck AG, Darmstadt                 |
| Natriumhydrogenphosphat                | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Natriumhydroxid                        | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Natrium-Lauroyl-Sarcosin               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Natriumnitrit                          | E. Merck AG, Darmstadt                 |
| Natriumpyruvat                         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Nicotinamadenindinukleotid             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Polyethylenglykol 8000 (PEG)           | ICN Biomedicals GmbH, Eschwege         |
| Penicillin / Streptomycin              | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Phenol, pH 4,5 – 5 (Aqua-Roti-Phenol)  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Phenol, pH 7,5 – 8 (Roti-Phenol)       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Phosphorsäure                          | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| RNase A                                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Ponceau Rot S                          | E. Merck AG, Darmstadt                 |
| Rolipram                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Saccharose                             | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Schwefelsäure                          | E. Merck AG, Darmstadt                 |
| Sedolit-Kügelchen                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Sulphanilamid                          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen |
| Tautomycin                             | Q Biogene Alexis GmbH, Grünberg        |
| 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)    | BD Biosciences Pharmingen, San Diego   |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED)         | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Trichloressigsäure                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Tris <i>Ultra Pure</i>                 | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Triton X-100                           | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Trypanblau                             | Biochrom AG, Berlin                    |
| Tween-20                               | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Wasserstoffperoxid                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Xylencyanol                            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |



## 2. Milli-Q-Wasser

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer Milli-Q-Wasserhochreinigungsanlage der Firma Millipore GmbH, Eschborn, hergestellt.

## 3. Zellkultur

### 3.1. Die permanente Zelllinie RAW 264.7

Die Durchführung der Zellkulturexperimente der vorliegenden Arbeit erfolgte mit der etablierten Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 (TIB-71, ATCC, Rockville, Maryland, USA). Hierbei handelt es sich um eine adhärent wachsende, murine Monozyten/Makrophagen-Tumorzelllinie. Diese Zellen stammen ursprünglich aus einem durch den Abelsonmausleukämievirus induzierten Tumor in der Maus.

### 3.2. Allgemeine Methoden

Den Angaben von Mishell & Shiigi [1980] sowie Lindl & Bauer [1987] folgend wurden die allgemeinen Methoden für zellbiologisches Arbeiten mit Säugerzellen sowie die Methoden zur Behandlung der verwendeten Materialien, Geräte und Chemikalien entnommen. Eventuelle Abweichungen hiervon sind entsprechend vermerkt.

Die Kultivierung der Makrophagen erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (Typ B 5060/CO<sub>2</sub>, Heraeus GmbH, Hanau) mit automatischer Regulierung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes auf 5%. Die sterilen Arbeiten wurden in einer Sterilbank (Laminair Air HB2448, Heraeus GmbH, Hanau bzw. Laminair Air Flow, Typ BHNG, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim) durchgeführt.

#### 3.2.1. Sterilisation der verwendeten Materialien

Die in der Zellkultur verwendeten Eppendorfreaktionsgefäße und Plastikpipettenspitzen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden für 15 Minuten bei 121°C und einem Druck von 2 bar autoklaviert und anschließend in einem Wärmeschrank bei 100°C getrocknet.

#### Steril bezogene Kunststoffmaterialien und ihre Bezugsquellen:

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| 6- und 24-well-Platten                          | Biochrom AG, Berlin            |
| Zellkulturflaschen (25 und 75 cm <sup>2</sup> ) | Biochrom AG, Berlin            |
| Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)              | Carl Roth GmbH, Karlsruhe      |
| Petrischalen                                    | Carl Roth GmbH, Karlsruhe      |
| Kryoröhrchen                                    | Nalgene Company, New York, USA |

Die Sterilisation maschinell ausgewaschener Glasmaterialien erfolgte im Sterilschrank bei 160°C trockener Hitze für 2 Stunden.

Glaspasteurpipetten (230 mm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) dienten zur Herstellung von Zellschabern zum Ablösen der adhärent wachsenden Zellen. Der obere Teil der Pipette wurde hierfür in einer Bunsenbrennerflamme stark erhitzt und umgebogen. Nach dem Erkalten wurde ein kleines Stück Silikonschlauch auf die Glasspitze gesteckt. Die Zellschaber wurden einzeln in Aluminiumfolie gepackt, in 6- bis 8er Einheiten in einer Umverpackung aus Aluminiumfolie zusammengefasst und bei 121°C und 2 bar in 15 min autoklaviert. Die Trocknung erfolgte bei 100°C im Trockenschrank.

### 3.2.2. Bestimmung von Lebendzellzahl und Vitalität

Die Trypanblau-Exklusionsmethode ermöglicht eine differentielle Unterscheidung von lebenden und toten Zellen. Isotonische Trypanblaulösung wird zu einem Aliquot der Zellsuspension zugegeben, das Trypanblau durchdringt die Plasmamembranen beschädigter und toter Zellen und färbt deren Zellproteine aufgrund seiner anionischen Eigenschaft bei einem physiologischen pH-Wert an. Vitale, unbeschädigte Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff hingegen nicht auf und erscheinen unter dem Mikroskop farblos. Für die Durchführung wurde das Zellsediment in 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Größe des Sediments wurde ein Aliquot von 50 bzw. 100 µl Zellsuspension mit einer isotonischen Trypanblau-Lösung 1:10 bzw. 1:5 verdünnt. In einer Thoma-Zählkammer mit definiertem Volumen wurden die farblosen, intakten Zellen gezählt. Zur Berechnung der Gesamtlebendzellzahl im Sediment wurden das Volumen und die Verdünnung der Zellsuspension sowie das Volumen der Thoma-Zählkammer berücksichtigt.

#### Isotonische Trypanblau-Lösung

|                |             |
|----------------|-------------|
| Natriumchlorid | 0,85% (w/v) |
| Trypanblau     | 0,16% (w/v) |

### 3.2.3. Langzeitkonservierung von Zellen

Flüssiger Stickstoff eignet sich aufgrund seiner niedrigen Temperatur von -196°C ideal zur Aufbewahrung von Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg (Kryokonservierung). Um beim schnellen Einfrieren zu Beginn eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wird den Zellen Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt, das in der Art eines Gefrierschutzmittels fungiert. Als kleines, fettlösliches Molekül diffundiert es leicht durch die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran und gelangt in das Innere der Zelle. Hier verdrängt es einen Teil des Wassers, verhindert dadurch die Entstehung von Eiskristallen, die die Zellmembran zerstören könnten, und erniedrigt zudem den Gefrierpunkt.

Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit 10% DMSO / fötalem Kälberserum (FCS) auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen überführt und in einer Styroporbox stehend langsam bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Am nächsten Tag, spätestens jedoch nach 7 Tagen, wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Zum raschen Auftauen der konservierten Zellen wurde das Kryoröhrchen in einem auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmten Wasserbad geschwenkt. Die Zellen wurden sofort in frisches Medium überführt, zweimal zur Entfernung des DMSO gewaschen und in Zellkulturflaschen mit frischem Kulturmedium ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank.

### **3.3. Medien, Zusätze und Lösungen**

Die Herstellung aller verwendeten Medien und Lösungen erfolgte mit Milli-Q-Wasser. Hitzeresistente Lösungen und Medien wurden durch Autoklavieren für 15 min bei  $121^\circ\text{C}$  bei einem Druck von 2 bar sterilisiert. Enthielten die Lösungen oder Medien hitzelabile Komponenten wie z.B. Antibiotika, so wurden sie sterilfiltriert (Vacu Top-Filter, Porengröße  $0,22 \mu\text{m}$ ; Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

#### **3.3.1. Das Grundmedium**

Als Basismedium für die Kultivierung der RAW 264.7-Makrophagen wurde DMEM-Medium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verwendet. Das Medium wurde bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert, kurz vor der Verwendung auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt und mit den nachfolgend aufgeführten Zusätzen zum vollwertigen Kulturmedium supplementiert.

#### **3.3.2. Bestandteile des vollwertigen Kulturmediums**

##### ***L-Glutamin***

Die Aminosäure Glutamin stellt für kultivierte Zellen eine der wichtigsten Kohlenstoffquellen dar und ist zugleich Ausgangsmolekül für die Synthese zahlreicher Proteine. Gemeinsam mit Glucose dient Glutamin zudem als Energielieferant, der dem Energiestoffwechsel über den Citratzyklus zur Verfügung gestellt wird. Glutamin ist instabil und wird daher in aliquotierter Form als steril-filtrierte Stammlösung [200 mM; Carl Roth GmbH, Karlsruhe] bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

##### ***Natriumpyruvat***

Eine weitere Energiequelle für kultivierte Zellen stellt Natriumpyruvat dar, da es zur Energiegewinnung ebenfalls dem Citratzyklus zugeführt werden kann [Morgan & Darling, 1994]. Die fertige, steril von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogene Stammlösung [200 mM] wurde bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt und dem Kulturmedium unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

### ***Penicillin und Streptomycin***

Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen wurde das Grundmedium mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt. Penicillin unterdrückt die bakterielle Zellwandbiosynthese, Streptomycin beeinflusst die Proteinbiosynthese in Bakterien. Die fertige, sterile Stammlösung (10.000 U/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde in aliquotierter Form bei –20°C gelagert und dem Medium erst kurz vor dessen Verwendung zugegeben.

### ***Fötales Kälberserum***

Die in tierischen Seren enthaltenen Polypeptide, Lipide, Hormone, Spurenelemente, Bindungsproteine, anorganischen Salze und Anheftungsfaktoren sind für ein optimales Wachstum kultivierter Zellen essentiell. Aus diesem Grund wurde dem Grundmedium fötales Kälberserum (FCS; Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) zugefügt. Zuvor wurden durch eine Erwärmung des Serums auf 56°C für 30 min möglicherweise vorhandene, hitzelabile Plasmaproteinen, sogenannte Komplementfaktoren, inaktiviert. Eine direkt durch ein Mitogen oder indirekt durch an Pathogene gebundene Antikörper ausgelöste Komplementaktivierung kann nach Morgan & Darling [1994] zur Lyse von Zellen führen.

### **3.3.3. Das Kulturmedium**

Unmittelbar vor der Verwendung wurde das Grundmedium folgendermaßen zum Kulturmedium vervollständigt:

#### **DMEM-Kulturmedium**

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| FCS                       | 10% (v/v)   |
| L-Glutamin                | 2 mM        |
| Natriumpyruvat            | 1 mM        |
| Penicillin / Streptomycin | 10.000 U/ml |

Natriumhydrogencarbonat, das den Makrophagen einerseits als essentielle Kohlenstoffquelle dient, zum anderen aber auch den pH-Wert konstant hält, muss bei vielen Kulturmedien zugegeben werden, war im vorliegenden Fall im Grundmedium jedoch bereits enthalten.

### **3.4. Die Kultivierung der permanenten Zelllinie RAW 264.7**

RAW 264.7 ist eine Tumorzelllinie und besitzt die Fähigkeit, sich *in vitro* uneingeschränkt zu vermehren. Da ab einer bestimmten Zellzahl die im Medium enthaltenen Nährstoffe jedoch stark limitiert sind, müssen die Zellen 2-3 mal wöchentlich passagiert werden, d.h. die Zellen werden in verringerter Anzahl in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem Kulturmedium ausgesät. Zur Entfernung abgestorbener oder nicht adhärent wachsender Zellen wurde das verbrauchte Medium zunächst abgesaugt. Mit Zellschabern wurden die Makrophagen in frischem Medium vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen (50

ml) überführt und zentrifugiert (1.200 rpm, 4°C, 10 min; Hettich Universal 30 RF). Nach der Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Exklusionsmethode wurden die Zellen mit Kulturmedium auf die gewünschte Zellzahl pro ml eingestellt und in 25- oder 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt. Die Kultivierung der Makrophagen erfolgte in automatisch geregelten Begasungsbrutschränken (Typ B 5060/CO<sub>2</sub>, Heraeus GmbH, Hanau) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre für 2 bis 3 Tage.

Vor ihrer Verwendung in den jeweiligen Zellkulturexperimenten wurden die Zellen auf die erforderliche Konzentration eingestellt, in Abhängigkeit des Versuchs in Petrischalen, 6- oder 24-well-Platten ausgesät und mindestens für 2 Stunden im Begasungsbrutschrank inkubiert. Diese Zeit ist bei adhärent wachsenden Makrophagen erforderlich, um die Adhärenz zu gewährleisten. Um durch Kryokonservierung oder Mutationsereignisse womöglich verursachte physiologische Abweichungen in den Experimenten weitestgehend ausschließen zu können, fanden nur Zellen Verwendung, die zwischen 5 und 50-mal passagiert worden waren.

### 3.5. Einsatz von Lipopolysaccharid

In der vorliegenden Arbeit wurden Makrophagen *in vitro* mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, das aus dem Bakterienstamm *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) 19 isoliert worden war. Nach der Phenol/Wasser-Methode [Westphal et al., 1952] war das LPS extrahiert und nachfolgend nach der Methode von Gmeiner [1975] aufgereinigt worden. Bei dieser Methode werden zwei LPS-Typen isoliert, die sich hinsichtlich der Längen ihrer O-Polysaccharidketten unterscheiden. Durch Ultrazentrifugation ist eine Trennung der beiden Ketten aufgrund ihrer unterschiedlichen Lösungseigenschaften in Wasser möglich. Verwendet wurde das von G. Weber am 23.1.1989 isolierte und zur Verfügung gestellte kurzkettige LPS I.

Für jeden separaten Versuch wurde eine 20-fache Stammlösung [20 µg/ml] frisch hergestellt. Hierfür wurde das LPS nach der Einwaage (Feinwaage Typ M5, E. Mettler, Zürich, Schweiz) in ¼ des Endvolumens in 0,05 N Natriumhydroxid aufgenommen und 10 min in einem Ultraschallwasserbad (Bransonic, Soest, Niederlande, Soest, Niederlande) homogenisiert. In Abhängigkeit der jeweiligen Versuche wurde die Stammlösung durch die Zugabe von FCS-freiem Medium (für die Herstellung der Lysate für Western-Blot) bzw. Kulturmedium (für alle anderen Versuche) auf das gewünschte Endvolumen fertiggestellt. Bei Zugabe zu den Zellen wurde die 20-fache Stammlösung auf die erforderliche Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Die Stimulierungszeit betrug je nach Versuch zwischen 0 und 24 Stunden.

### 3.6. Einsatz von Reagenzien zur Modulation der Cytokin- und NO-Produktion

Alle in dieser Arbeit zur Modulation der untersuchten Enzyme eingesetzten Reagenzien wurden nach den Angaben ihrer Hersteller gelöst und bis zur Verwendung aufbewahrt. Für

den Einsatz in den jeweiligen Zellkulturexperimenten wurden die Stammlösungen entweder in FCS-freiem (Lysate für Western-Blot) oder in vollständigem Kulturmedium (alle weiteren Versuche) verdünnt. Es wurden von allen Modulatoren 20-fach konzentrierte Lösungen hergestellt, die bei der Zugabe zu den Zellen auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt wurden.

### 3.6.1. Di-buturyl-cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit war der Einsatz von cAMP, einem intrazellulären Signalmolekül (*second messenger*), das bei vielen Signalübertragungsreaktionen in verschiedenen Systemen eine wichtige Rolle spielt. Anstelle von cAMP fand hier das cAMP-Analogon di-buturyl-cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat (dB-cAMP; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) Verwendung, das von den Zellen leichter aufgenommen werden kann. Mit *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Wasser wurde eine Stammlösung [0,2 mM] hergestellt und diese in aliquotierter Form bei -20°C aufbewahrt.

### 3.6.2. Der Phosphodiesterase 4-Inhibitor Rolipram

Rolipram (4-(3'-Cyclopentyloxy-4'-methoxyphenyl)-2-pyrrolidon; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) ist ein pharmazeutisch entwickelter, spezifischer Inhibitor der Phosphodiesterase (PDE) 4 (Abb. 12). Die Stammlösung [10 mM] wurde nach den Angaben des Herstellers mit sterilem DMSO hergestellt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

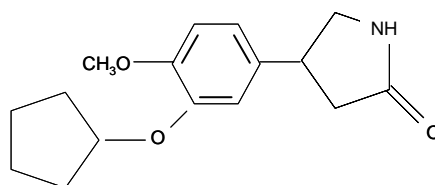
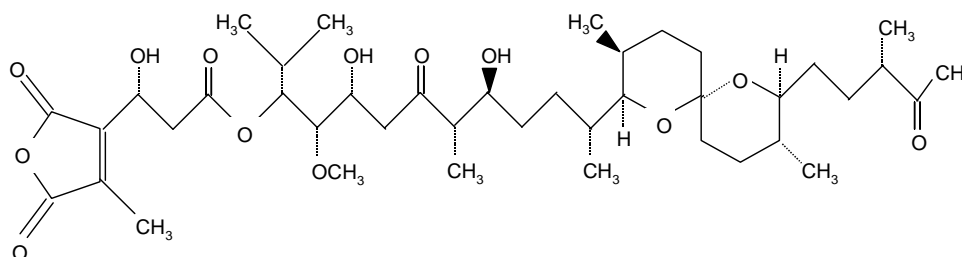


Abb. 12: Der PDE 4-Inhibitor Rolipram

### 3.6.3. Der Proteinphosphatase 1-Inhibitor Tautomycin

Das Antibiotikum Tautomycin (Q Biogene Alexis GmbH, Grünberg; Abb. 13) ist ein aus dem Bakterienstamm *Streptomyces spiroverticillatus* isolierter spezifischer Inhibitor der Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2A [Kawamura et al., 1998], wobei es stärker inhibierend auf die PP1 wirkt als auf die PP2A [Liu et al., 2002; MacKintosh & Klumpp, 1990].



**Abb. 13: Der PP1-Inhibitor Tautomycin**

Tautomycin wurde abweichend von den Angaben des Herstellers, der das Lösen des Lyophilisats in Methanol empfohlen hatte, in gesundheitlich unbedenklicherem Ethanol gelöst. Wie sich in den Zellkulturexperimenten zeigte, hatte der verwendete Alkohol keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis. Es wurde eine Stammlösung [50  $\mu$ M] hergestellt und diese bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### 3.7. Stimulierung und Inhibition der RAW 264.7-Makrophagen

Abhängig vom jeweiligen Versuch wurden  $8 \times 10^5$  Zellen je *well* einer 24-*well*-Platte oder  $3,2 \times 10^6$  Zellen je *well* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Nach einer Anheftungszeit von mindestens 2 Stunden wurde der Überstand entfernt und das Kulturmedium erneuert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen in 1  $\mu$ g/ml LPS in An- oder Abwesenheit von dB-cAMP, Rolipram oder Tautomycin. Das Endvolumen je *well* einer 24-*well*-Platte betrug 1 ml, das je *well* einer 6-*well*-Platte 2 ml. Voruntersuchungen hatten ergeben, dass der Zugabezeitpunkt der Reagenzien keine Rolle bei der Regulation und Produktion der zu untersuchenden proinflammatorischen Cytokine spielt (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund erfolgte die Zugabe in allen vorliegenden Versuchen gleichzeitig mit LPS. Die Inkubationsdauer variierte abhängig vom Versuch zwischen 0 und 24 Stunden. Zeitkinetik-Experimente begannen mit der Behandlung der Proben mit der längsten Inkubationszeit, so dass bis zum Zeitpunkt Null alle Versuchsansätze gleichzeitig beendet waren.

### 3.8. Messung der Cytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase-Test

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein cytosolisches Enzym, das in allen Säugetierzellen konstitutiv exprimiert wird. Sie wird von intakten Zellen nur in geringem Maße sezerniert und ist daher in vitalen Zellen nur im Lysat nachweisbar. Eine erhöhte LDH-Aktivität im Überstand deutet auf eine Schädigung der Zellen hin.

Von Tautomycin [500 nM] war bereits durch Untersuchungen von Schilling [2000] bekannt gewesen, dass es die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen

verändert. Um eine zellschädigende, cytotoxische Wirkung der verwendeten Konzentrationen von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin ausschließen zu können, wurden verschiedene Konzentrationen dieser Modulatoren mit Hilfe des LDH-Tests überprüft.

Zur Durchführung wurden  $4 \times 10^5$  Zellen für 24 Stunden mit 1 µg/ml LPS in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin verschiedener Konzentration in den *wells* einer 24-*well*-Platte inkubiert. Eine Mediumskontrolle ohne Zugabe von LPS sowie eine Positivkontrolle (ATP, 10 mM) wurden mitgeführt. Nach dem Entfernen des Kulturüberstands wurden die Zellen mit 1 ml Triton-X100 (0,1% v/v) pro *well* in 20 min auf dem Schüttler lysiert. Die Durchführung des LDH-Tests erfolgte nach der Methode von Schnyder & Baggiolini [1978] nach den Angaben von Taff & Sitkovsky [1994]. Für die Auswertung wurde der prozentuale Anteil der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand relativ zur Gesamtaktivität in Überstand und Lysat ermittelt.

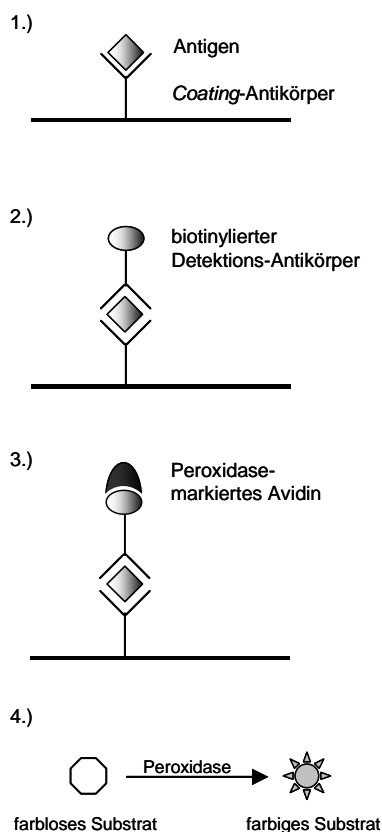
### 3.9. Nachweis der Cytokin-Produktion mittels enzymgebundener Immuno-Assays

Der Nachweis verschiedener Cytokine in den Überständen oder Lysaten erfolgte über enzymgebundene Immuno-Assays (ELISA) nach der so genannten „*Sandwich-Methode*“ (Abb. 14). Bei diesem Verfahren wird ein spezifischer Antikörper über Nacht an eine feste Phase gebunden („*gecoatet*“) und anschließend mit einer unbekannten Antigen-Lösung inkubiert (Abb. 14/1). Der Komplex aus *Coating*-Antikörper und spezifisch gebundenem Antigen wird mehrfach mit Waschpuffer gewaschen und mit einem Biotin-markierten Detektions-Antikörper inkubiert (Abb. 14/2). Der Detektions-Antikörper erkennt ein weiteres Epitop des Antigens ebenfalls spezifisch. Nach weiteren Waschschritten wird dem Komplex Peroxidase-gekoppeltes Avidin zugegeben, das an das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet (Abb. 14/3). Nach Zugabe der Substrat-Lösung katalysiert die Peroxidase die Spaltung des farblosen Substrates, wodurch ein farbiges Produkt entsteht (Abb. 14/4), das spektralphotometrisch detektiert werden kann.

Zur quantitativen Bestimmung der Cytokin-Produktion wurden  $8 \times 10^5$  RAW Makrophagen mit 1 µg/ml LPS in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP, Rolipram oder Tautomycin stimuliert. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 0 und 24 Stunden. Die verwendeten Konzentrationen der Modulatoren sind beim jeweiligen Versuch angegeben.

Bei allen Experimenten wurde eine Mediums- sowie eine LPS-Kontrolle mitgeführt. Die Absorptionsmessungen erfolgten im ELISA-Reader (EAR 400 ATX, SLT Labinstrumente Deutschland, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450$  nm gegen eine Referenzwellenlänge von  $\lambda = 690$  nm. Über einen mitgeführten Standard konnte nachfolgend die Cytokin-Produktion in den Proben ermittelt werden.





Als Substrat diente 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), das direkt vor der Verwendung im Verhältnis 1:1 aus den Komponenten A und B (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) gemischt wurde. Die Reaktion wurde mit 2 N Schwefelsäure abgestoppt.

**Abb. 14: Schematischer Ablauf des *enzyme-linked immuno-sorbent assay* (ELISA) nach der *Sandwich-Methode***  
(Erläuterungen siehe Text)

### 3.9.1. Gewinnung von Überständen und Lysaten

Nach Ende der Inkubationsdauer wurden die Überstände in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und für die Durchführung von NO-Test, TNF $\alpha$ - und IL-6-ELISA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 1 ml Triton-Lyselösung pro *well* in 20 min auf dem Schüttler.

#### **Triton-Lyselösung**

Triton-X100                      0,1% (v/v)

Die Lysate wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bis zu ihrer Verwendung im IL-1 $\beta$ -ELISA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Zum Nachweis der murinen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  wurden selbsthergestellte ELISA nach den Angaben der Hersteller mit den unten aufgeführten Reagenzien unter Verwendung von Lysaten bzw. Kulturüberständen durchgeführt (Tabelle 2). Die geeigneten Konzentrationen der Antikörper und der Avidinperoxidase waren in Voruntersuchungen ermittelt worden.

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten ELISA-Kits**

| Nachzuweisendes Cytokin                             | Name des Kits / Hersteller                | Messung des Cytokins |
|---|---|----------------------|
| murines Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )       | ELISA DuoSet <sup>®</sup> / R&D Systems   | im Lysat             |
| murines Interleukin-6 (IL-6)                        | ELISA DuoSet <sup>®</sup> / R&D Systems   | im Überstand         |
| muriner Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) | BD OptEI <sup>®</sup> Set / BD Pharmingen | im Überstand         |

**Nachweis der IL-1 $\beta$ -Produktion**

Coating-Antikörper: Anti-Maus IL-1 $\beta$ , monoklonal; Einsatz: 4  $\mu$ g/ml  
 Detektions-Antikörper: Anti-Maus IL-1 $\beta$ , polyklonal, biotinyliert; Einsatz: 0,1  $\mu$ g/ml  
 Standard: rekombinantes, murines IL-1 $\beta$

**Nachweis der TNF $\alpha$ -Produktion**

Coating-Antikörper: Anti-Maus TNF $\alpha$ , monoklonal; Einsatz: 1:250-Verdünnung der im Kit enthaltenen Stammlösung  
 Standard: rekombinantes, murines TNF $\alpha$   
 Anstelle des empfohlenen Coating-Puffers wurde PBS (pH 7,2) eingesetzt.

Im TNF $\alpha$ -ELISA wurde zur Detektion eine Lösung eingesetzt, die bereits Detektions-Antikörper und Avidin-HRP enthielt;

Einsatz: Verdünnung der im Kit enthaltenen Stammlösung 1:250

**Nachweis der IL-6 Produktion**

Coating-Antikörper: Anti-Maus IL-6, monoklonal; Einsatz: 2  $\mu$ g/ml  
 Detektions-Antikörper: Anti-Maus IL-6, polyklonal, biotinyliert; Einsatz: 0,2  $\mu$ g/ml  
 Standard: rekombinantes, murines IL-6

Die verwendete Enzym-Lösung war für die IL-1 $\beta$ - und IL-6-ELISA-Systeme identisch:

Streptavidin-horseradish-peroxidase (HRP)

In allen drei ELISA-Systemen wurde das gleiche Substrat eingesetzt:

3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB; BD Pharmingen)

**3.10. Nachweis der Produktion von Stickstoffmonoxid**

Nach der Stimulierung durch Antigene produzieren Makrophagen neben proinflammatorischen Cytokinen u.a. Stickstoffmonoxid (NO), das im Kulturüberstand sofort zu Nitrit (NO<sub>2</sub>) oxidiert wird [Nathan & Hibbs, 1991]. Die Messung von Nitrit wurde daher als indirekte Messung der Stickstoffmonoxid-Produktion durchgeführt. Makrophagen wurden für verschiedene Inkubationszeiten mit LPS in An- oder Abwesenheit der modulierenden Reagentien stimuliert. Nach den Angaben von Stuehr & Nathan [1989] erfolgte die Zugabe von Griess-Ilosvays-Reagenz, das unmittelbar vor der Verwendung aus zwei Komponenten (A und B; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) im Verhältnis 1:1 gemischt wurde, zu Aliquots der Kulturüberstände. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe bekannter

Konzentration von Natriumnitrit mitgeführt. Durch Kolorimetrie wurde die produzierte Menge Stickstoffmonoxids in den Kulturüberständen indirekt ermittelt.

**Komponente A**

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Naphtylendiamin-dihydrochlorid | 0,1% (w/v) |
|--------------------------------|------------|

**Komponente B**

|               |            |
|---------------|------------|
| Sulphanilamid | 1,0% (w/v) |
|---------------|------------|

|               |            |
|---------------|------------|
| Phosphorsäure | 2,5% (v/v) |
|---------------|------------|

### 3.11. Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB

#### 3.11.1. Herstellung der Gesamtzelllysate

$4 \times 10^6$  RAW 264.7-Makrophagen wurden zur Herstellung der Gesamtzelllysate für den Einsatz in der Western-Analyse zunächst in FCS-freiem Kulturmedium ausgesät, um eine mögliche Aktivierung des nachzuweisenden Transkriptionsfaktors durch FCS-Proteine zu verhindern. Verbunden mit einem Mediumswechsel wurden die Zellen nach 2,5 bis 3,5 Stunden Anheftungszeit für verschiedene Zeiten mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram oder Tautomycin inkubiert. Die LPS- und Inhibitor-Lösungen wurden ebenfalls mit FCS-freiem Medium hergestellt. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Ende der Inkubationszeit rasch und einzeln mit 100 µl Laemmli-Puffer (1-fach konzentriert) unter Verwendung eines Zellschabers, mit dem die Zellen abgelöst wurden. Die Proben wurden sofort in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt und auf Eis bzw. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Laemmli-Puffer, 1-fach konzentriert**

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| Glycerin                 | 10% (v/v)    |
| Tris/HCl, pH 6,75        | 0,0625 M     |
| SDS                      | 2% (v/v)     |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 5% (v/v)     |
| Bromphenolblau           | 0,001% (w/v) |

Aufgrund der hohen Probenviskosität mussten die Lysate vor der Bestimmung ihres Proteingehaltes durch Aufkochen (5 min,  $100^{\circ}\text{C}$ ) und mehrmalige Beschallung im Ultraschallwasserbad (Branson, Soest, Niederlande) für je 1 Minute homogenisiert werden.

#### 3.11.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Um in den Western-Analysen gleiche Mengen an Protein einsetzen zu können, wurden die Proben zunächst in einem auf der Bradford-Methode [Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996] basierenden Assay auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Verwendung fand hierfür die Roti<sup>→</sup>-Nanoquant-Lösung der Firma Roth (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Eine BSA-Konzentrationsreihe wurde für die Erstellung einer Eichgeraden im Assay mitgeführt, mit deren Hilfe die jeweilige Proteinmenge in den Proben ermittelt werden konnte.

### 3.11.3. Elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen

Aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte können Proteingemische mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Die von Lugtenberg et al. [1975] beschriebene Methode zur Durchführung der SDS-PAGE wurde unter Beibehaltung des Puffersystems von Laemmli [1970] modifiziert durchgeführt. Der mitgeführte Proteingrößenstandard *prestained protein ladder* (10-180 kDa; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurde bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Für die Herstellung der Gele wurde die Gelkammer Mighty-Small SE 235 (Hoefer Scientific Instruments, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers zusammengesetzt.

#### **Trenngel (12%)**

|                                 |        |       |
|---------------------------------|--------|-------|
| 30% Acrylamid-0,8% bisacrylamid | 12%    | (v/v) |
| Tris/HCl, pH 8,8                | 0,375  | M     |
| SDS                             | 0,1%   | (v/v) |
| Ammoniumperoxidsulfat           | 0,08%  | (v/v) |
| Tetramethylethyldiamin          | 0,08 % | (v/v) |

Unmittelbar nach dem Gießvorgang wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine geradlinige Trennung zwischen Trenn- und nachfolgendem Sammelgel zu erhalten. Das Isopropanol wurde nach der Auspolymerisierung des Trenngels und vor Zugabe der Sammelgel-Lösung durch Abgießen entfernt.

#### **Sammelgel (4,5%)**

|                                 |        |       |
|---------------------------------|--------|-------|
| 30% Acrylamid-0,8% bisacrylamid | 4,5    | (v/v) |
| Tris/HCl, pH 6,8                | 0,375  | M     |
| SDS                             | 0,1%   | (v/v) |
| Ammoniumperoxidsulfat           | 0,08%  | (v/v) |
| Tetramethylethyldiamin          | 0,08 % | (v/v) |

Die Gele wurden frisch, spätestens jedoch 5 Tage nach ihrer Herstellung, zur elektrophoretischen Auftrennung der Zellysate verwendet. Die Aufbewahrung erfolgte einzeln in feuchter Atmosphäre bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

Je  $20\text{ }\mu\text{g}$  der Zellysate wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  und 5-fach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt, auf ein Volumen von  $20\text{ }\mu\text{l}$  eingestellt und gemischt. Den Angaben des Herstellers folgend wurden die Gele in die Vertikalkammer (Mighty Small SE 260, Hoefer Scientific Instruments, Heidelberg) eingesetzt und mit Elektrophorese-Puffer überschichtet.

#### **Elektrophorese-Puffer, 1-fach konzentriert**

|        |            |
|--------|------------|
| Tris   | 0,025 M    |
| Glycin | 0,19 M     |
| SDS    | 0,1% (w/v) |

Die Proben wurden unmittelbar vor dem Beladen der Geltaschen für 5 min aufgekocht und zur Sedimentation ungelöster Bestandteile zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, Biofuge 13, Heraeus GmbH, Hanau). Die Elektrophorese-Kammer (Mighty Small SE 260, Hoefer

Scientific Instruments, Heidelberg) wurde in Abhängigkeit des Versuchs mit einem oder zwei Gelen betrieben und gemäß den Vorgaben des Herstellers an eine Wasserkühlung angeschlossen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA je Gel und einer Spannung von maximal 250 V. Die Elektrophorese dauerte etwas länger als 2 Stunden und wurde beendet, sobald das kleinste Fragment des Proteinstandards den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

#### 3.11.4. Western-Blot

Beim Western-Blot handelt es sich um die Übertragung eines durch Elektrophorese aufgetrennten Antigen-Gemischs auf eine Nitrocellulose-Membran. Danach können bestimmte einzelne Antigene durch die Reaktion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die Sensitivität der Western-Analyse hängt in starkem Maße davon ab, in wieweit es gelingt, ein unspezifisches Binden der Antikörper an das Membranmaterial durch eine Blockierung zu verhindern. Der eigentlichen Immunreaktion geht daher ein Blockierungsschritt voraus, bei dem alle nicht-spezifischen Bindestellen auf der Membran abgesättigt werden.

Nach Behandlung der Membran mit dem Erst-Antikörper sollte dieser an das Antigen auf der Membran gebunden haben. Der entstandene Antikörper-Antigen-Komplex wird von einem zweiten, enzym-gebundenen Antikörper spezifisch erkannt und bei der anschließenden Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Films durch Substratumsetzung sichtbar. Das Verfahren beruht auf einem indirekten Nachweis, da der enzym-gekoppelte Zweit-Antikörper ein weiteres Epitop des Antigens spezifisch erkennt und der Nachweis mittels Substratumsetzung durch das Enzym erfolgt.

#### 3.11.5. Antikörper und Substrat für den Einsatz in der Western-Analyse

Bei dem verwendeten Erst-Antikörper handelte es sich um einen spezifischen Antikörper gegen den phosphorylierten Serin-Rest 133 des Transkriptionsfaktors *cAMP-response element binding protein* (CREB). Bei diesem Versuch wurde für die Visualisierung der Antikörperbindung ein *enhanced chemiluminescence of luminol* (ECL) Analyse-System eingesetzt (SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate; Perbio Science GmbH, Bonn). Der an den Antigen-spezifischen Erstantikörper (muriner Phospho-CREB (Ser133) monoklonaler Antikörper; New England Biolabs, Frankfurt) bindende Zweitantikörper (Kaninchen anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) ist an das Enzym Peroxidase gekoppelt. Unter alkalischen Bedingungen wird das Substrat Luminol in einer enzymatisch katalysierten Reaktion oxidiert. Die Freisetzung von Licht durch diese Umsetzung führt zu einer Filmschwärzung.

### 3.11.6. Durchführung des Western-Blot

Die Nitrocellulose-Membran (Porablot, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) wurde vor dem Blot 5 min in Milli-Q-Wasser befeuchtet. Anschließend wurden das SDS-Gel und die Nitrocellulose-Membran 30 Minuten getrennt voneinander in Transfer-Puffer äquilibriert. Nach den Angaben des Herstellers wurde das „*Blotsandwich*“, bestehend aus SDS-Gel, Nitrocellulose-Membran und Schwämmen, zusammengesetzt und in die Blotkammer (Mighty Small TE-22; Hoefer Scientific Instruments, Heidelberg) eingelegt und eine Wasserkühlung angeschlossen. Die in gekühltem Transfer-Puffer durchgeführte Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte bei 400 mA und 100 V für 75 Minuten.

#### **Transfer-Puffer (Carbonatpuffer), pH 9,9**

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Natriumhydrogencarbonat | 10 mM     |
| Natriumcarbonat         | 3 mM      |
| Methanol                | 20% (v/v) |

Nach Beendigung des Blots wurde die Membran 5 Minuten in Ponceau Rot S (ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) gefärbt, um die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen und die Qualität von Protein-Auftrennung und Transfer überprüfen zu können. Die Fragmente des mitgeführten Protein-Standards wurden am Rand der Membran mit einem Bleistift markiert. Die anschließende Behandlung mit *Tris-buffered saline* (TBS) führte zur Entfärbung der Membran und der Proteinbanden.

#### **PBS-Tween (phosphate-buffered saline)**

|          |                |
|----------|----------------|
| PBS      | 9,55 g/l (w/v) |
| Tween-20 | 0,1% (v/v)     |

#### **TBS-Tween (Tris-buffered saline)**

|                |                |
|----------------|----------------|
| Tris-Base      | 2,42 g/l (w/v) |
| Natriumchlorid | 8,0 g/l (w/v)  |

#### **Ponceau Rot S-Lösung**

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Ponceau Rot S      | 0,2% (w/v) |
| Trichloressigsäure | 3% (v/v)   |

Das Risiko unspezifischer Bindungen wurde durch die Inkubation der Membran für eine Stunde in 5% Magermilchpulver reduziert. Hierfür wurden die Membranen auf dem Schüttler zunächst 3 x 5 min in TBS/0,1% Tween (v/v) gewaschen. Durch eine einstündige Inkubation der Membran mit 5% Magermilchpulver-/TBS-Tween-Lösung (Blockierungs-Lösung) wurde das Risiko unspezifischer Bindungsreaktionen verringert.

#### **Blockierungs-Lösung**

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| fettarmes Milchpulver | 5 % (w/v)      |
| Tris-Base             | 2,42 g/l (w/v) |
| Natriumchlorid        | 8,0 g/l (w/v)  |
| Tween-20              | 0,1 % (v/v)    |

Die Membran wurde dreimal mit TBS/Tween gewaschen (jeweils 5 min) und in 20 ml einer 1:2.000 in Blockierungspuffer verdünnten Erst-Antikörper-Lösung (muriner Phospho-CREB (Ser133) monoklonaler Antikörper; New England Biolabs, Frankfurt) für 1 Stunde unter

leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Der geeignete Antikörper-Verdünnungsfaktor war in Vorversuchen ermittelt worden. Die Aufbewahrung der Membran erfolgte bis zum folgenden Tag in der Antikörper-Lösung bei 4°C in feuchter Atmosphäre.

Durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Der Zweit-Antikörper Kaninchen-anti-Maus IgG, Peroxidase Konjugat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde 1:1.000 mit Blockierungs-Lösung verdünnt. Die Inkubation der Membran mit dem Zweit-Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nicht-gebundener Zweit-Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS/Tween entfernt. Um die Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar zu machen, wurden unmittelbar vor der Verwendung die Komponenten A und B der Substrat-Lösung (*SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate*; Perbio Science GmbH, Bonn) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Inkubation erfolgte für 5 Minuten. Überschüssiges Substrat wurde entfernt und die Membran in einer Folie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurde das Chemilumineszenz-Signal durch das Auflegen eines lichtsensitiven Films (Kodak BioMax Light-1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) für 5-30 Sekunden auf die Membran detektiert. Die Filmentwicklung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit Entwickler- und Fixierer-Lösung von Kodak.

## 4. Molekularbiologische Standardmethoden

### 4.1. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Eine einfache Möglichkeit, um die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA) in einer Lösung zu bestimmen, ist die Absorptionsspektroskopie. Dabei wird die Absorption einer Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) ermittelt.

Mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Formel kann ausgehend von der Absorption die Nukleinsäure-Konzentration einer unbekannten Probe ermittelt werden.

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{[260 \text{ nm}]} \times V \times \text{OD}$$

|                        |   |
|------------------------|---|
| $A_{[260 \text{ nm}]}$ | gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm |
| V                      | Verdünnungsfaktor der gemessenen Nukleinsäurelösung   |
| OD                     | optische Dichte                                       |

Eine OD von 1 bei  $\lambda = 260$  nm entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA oder  
40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger Nukleinsäure (DNA oder RNA)

Um eine Aussage über Proteinverunreinigungen in der Probe treffen zu können, wurde zusätzlich die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm bestimmt. Bei

dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren der Proteine. Der Quotient aus der Absorption bei  $\lambda = 260$  und  $\lambda = 280$  nm gibt einen Hinweis über die Reinheit der Nukleinsäure. Er sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### **4.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion von Nukleinsäuren**

Bei dieser Methode werden mittels eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Gemischs mit dem Verhältnis 25:24:1 Proteine aus einer Nukleinsäurelösung extrahiert. Phenol führt über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten der Proteine zur Auflösung von Protein-Nukleinsäure-Komplexen. Des weiteren werden die Proteine durch Phenol und Chloroform denaturiert. Die denaturierten, hydrophoben Proteine fallen in der Interphase zwischen wässriger Nukleinsäurelösung und phenolischer Phase aus. Isoamylalkohol unterstützt wie Chloroform die Trennung in eine organische und eine wässrige Phase. Die Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase können mit Isopropanol oder Ethanol gefällt werden. Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen PCI versetzt und gut gemischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min; Biofuge 13, Heraeus GmbH, Hanau) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Fällung der Nukleinsäure mit Ethanol.

#### **4.3. Fällen und Waschen von Nukleinsäuren**

Die Fällung von Nukleinsäuren ermöglicht eine Konzentrierung der Probe, einen Wechsel der Pufferbedingungen oder das Entfernen störender Salze. Die gebräuchlichsten Präzipitationsmittel sind Ethanol und Isopropanol.

Bei der angewandten Ethanolfällung wurde die Probe mit dem 2 bis 2,5-fachen Volumen an kaltem Ethanol versetzt und für 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde die gefällte Nukleinsäure durch Zentrifugation (13.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min) in einer Kühlzentrifuge (Universal RF30, Hettich GmbH, Tuttlingen) sedimentiert. Das Sediment wurde nach dem Verwerfen des Überstands in einem Vakuum-Exsikkator getrocknet (10 Minuten) und in 20  $\mu\text{l}$  HPLC-Wasser aufgenommen.

#### **4.4. Vermehrung und Isolierung von Plasmiden**

Für eine Transfektion benötigt man rekombinante DNA in Form von Plasmidvektoren. Zur Herstellung wird das zu untersuchende Gen in einen Vektor kloniert und dieser in *E. coli*-Zellen transformiert. Aufgrund von Antibiotika-Resistenzgenen auf den Plasmidvektoren kann eine Selektion der plasmidhaltigen Zellen durch den Zusatz des entsprechenden



Antibiotikums zum Medium erreicht werden. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren enthielten ein Ampicillin (Amp)-Resistenzgen.

Zur Vermehrung des Vektors wurden über Nacht Schüttelkulturen mit transformierten *E. coli*-Zellen (TOP 10F') in LB<sub>Amp</sub>-Medium bei 37°C inkubiert. Das Aufreinigungs-System AX 100 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) ermöglicht es, die aufzureinigenden Plasmide von den Bestandteilen der transformierten Zellen zu trennen. Hierfür finden Puffer Verwendung, die zunächst eine Zell-Lyse bewirken. Im weiteren bindet die im Zell-Lysat enthaltene Plasmid-DNA an eine Silicamembran. Nach Elution störender Bestandteile im Lysat wird die DNA von der Membran eluiert und durch Isopropanol gewaschen. Die Isolierung der Plasmide erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

**LB<sub>Amp</sub> (Luria-Bertani)-Medium, pH 7,5**

|                |            |
|----------------|------------|
| Hefeextrakt    | 0,5% (w/v) |
| Natriumchlorid | 0,2 M      |
| Casein, Pepton | 1% (w/v)   |
| Ampicillin     | 50 µg/ml   |

#### 4.4.1. Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Um Bakterien-Zellen effizient transformieren zu können, müssen sie transformationskompetent sein. Für diese Behandlung existieren verschiedene Methoden. Da für die vorliegende Arbeit nur chemisch-kompetente Zellen eine Rolle spielten, soll an dieser Stelle auf die anderen Möglichkeiten nicht näher eingegangen werden. Mit der von Nishimura et al. [1990] beschriebenen Polyethylenglycol (PEG)-Methode wurden *E. coli*-Zellen des Stammes TOP 10F' für die Transformationsversuche der vorliegenden Arbeit chemisch kompetent gemacht. Eine vereinzelte *E. coli*-Kolonie auf LB-Agar wurde in LB-Medium (5 ml) überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 µl der Zellsuspension in Medium A überführt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,55 bei  $\lambda = 578$  nm kultiviert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (3.500 rpm, 4°C, 10 min; Minifuge RF, Heraeus GmbH, Hanau), in 500 µl eisgekühltem Medium A resuspendiert und mit 2,5 ml kaltem Medium B vermischt.

**Medium A**

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| LB-Medium (autoklaviert) |            |
| Magnesiumsulfat          | 10 mM      |
| Glucose                  | 0,2% (w/v) |

**Medium B**

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| LB-Medium (autoklaviert) |           |
| Glycerin                 | 36% (v/v) |
| Magnesiumsulfat          | 12 mM     |
| Polyethylenglycol        | 12% (v/v) |

Die zur Transformation bereiten Zellen wurden in aliquotierter Form bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 4.5. Enzymatische DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen

Durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen konnten die isolierten Plasmide enzymatisch hydrolysiert und nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel überprüft werden (s. Material & Methoden). Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen MBI Fermentas (GmbH, St. Leon-Rot) und Promega (Corporation, Madison, USA) bezogen und nach den Angaben des jeweiligen Herstellers eingesetzt.

#### 4.6. Native DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 500 und 25.000 bp eignet sich die native 0,2-2%ige Agarose-Gelelektrophorese. Die effiziente Auftrennung wird dadurch möglich, dass die Phosphatgruppen von Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert ionisiert vorliegen, und diese Polyanionen dadurch im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße und Konformation in der Orientierung von der Kathode zur Anode wandern [Sambrook et al., 1989]. Durch die Mitführung eines externen DNA-Standards mit Fragmenten bekannter Größe ist die ungefähre Angabe der Molekülgrößen der aufgetrennten DNA-Fragmente möglich

1%ige (w/v) Agarosegele (Flachbettgelkammer, 8x8 cm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden in der vorliegenden Arbeit in Tris/Acetat/EDTA (TAE)-Puffer verwendet. Dieser Puffer wurde ebenfalls als Laufpuffer verwendet.

##### Tris/Acetat/EDTA (TAE)-Puffer

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Tris-Acetat, pH 8,0 | 40 mM |
| EDTA                | 1 mM  |

Vor der Auftragung wurden die Proben 5 min bei 65°C denaturiert und mit 1/6 Volumen Nukleinsäurefarbmarker (6 x *Loading Dye*, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Das Auftragsvolumen je Probe betrug 20 µl. Als Größenstandards wurden *DNA Gene Ruler* und *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (80 V, Stromstärke maximal, 2 Stunden) wurden die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) angefärbt und unter UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm; Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) photographiert. In der vorliegenden Arbeit wurden durch diese Methode die in den Transfektions-Experimenten einzusetzenden Plasmid-DNAs überprüft.

#### 5. Northern-Analysen zum Nachweis spezifischer mRNA

Spezifische RNA-Transkripte können durch Northern-Analysen unter Verwendung geeigneter Sonden nachgewiesen werden. Zunächst wird die extrahierte Gesamt-RNA elektrophoretisch in einem denaturierenden Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt. Als denaturierendes Agens

wird Formaldehyd eingesetzt, das die Ausbildung von Sekundärstrukturen der einzelsträngigen RNA-Moleküle verhindern soll [Lehrach et al., 1977]. Durch die Hybridisierung mit Digoxigenin (DIG)-markierten, spezifischen Sonden wurde der Nachweis einzelner RNA-Transkripte durchgeführt und die Detektion über Chemilumineszenz-Signale ermittelt. Zwecks Fixierung werden die aufgetrennten Nukleinsäure-Fragmente im Northern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen und fixiert.

### 5.1. Allgemeine Hinweise zum Arbeiten mit RNA

Um mit RNA arbeiten zu können und den Abbau von RNA zu verhindern, ist es notwendig, ubiquitär vorkommende RNasen zu zerstören oder zu inhibieren. Dies kann durch die Einhaltung bestimmter Material- und Chemikalien-Vorbehandlungen erfolgen, wie sie von Sambrook et al. [1989] und Ausubel et al. [1995] beschrieben wurden:

|                    |  |
|--------------------|--|
| Plastikmaterialien | 30 min in 3% (v/v) Wasserstoffperoxid<br>Trocknung<br>Autoklavieren  |
| Glasmaterialien    | 2 Stunden bei 160°C trockener Hitze sterilisiert   |
| Milli-Q-Wasser     | Zugabe von 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC)<br>Inkubation über Nacht bei 37°C<br>Autoklavieren (1 Stunde) |
| Lösungen           | Zugabe von 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC)<br>Inkubation über Nacht bei 37°C<br>Autoklavieren (1 Stunde) |

Nicht-autoklavierbare, temperaturempfindliche Lösungen wurden in RNase-freiem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

### 5.2. RNA-Isolierung aus Makrophagen

Nach einer modifizierten *single-step*-Extraktionsmethode nach Chomczynski & Sacchi [1987] wurde die Gesamt-RNA aus RAW 264.7-Makrophagen nach 0 bis 24 Stunden Stimulierungsdauer mit LPS [1 µg/ml] bei gleichzeitiger An- oder Abwesenheit der verschiedenen Modulatoren isoliert. Mit Guanidiniumisothiocyanat (GSCN)-Extraktionspuffer, der RNase-inhibierend wirkt, wurden die Zellen sauer lysiert. Nach dem gleichen Prinzip funktioniert die von AppliChem (GmbH, Darmstadt) angebotene RNAtidy G-Lösung, die bei der Isolierung der Gesamt-RNA in einigen Versuchen aus Gründen der Zeitersparnis eingesetzt wurde. Durch eine anschließende PCI-Extraktion wurde in beiden Fällen die Gesamt-RNA von Proteinen und DNA getrennt.

Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte mit einem einfachen Ansatz von  $3,2 \times 10^6$  Zellen. Der Kulturüberstand wurde entfernt und die Zellen mit 400 µl Extraktionspuffer/*well* versetzt. Die Lyse erfolgte in 20 Minuten auf dem Schüttler.

**Guanidiniumisothiocyanat (GSCN)-Extraktionspuffer**

|                              |            |
|------------------------------|------------|
| Guanidiniumisothiocyanat     | 4 M        |
| Natrium-N-Lauroyl-Sarcosinat | 0,5% (v/v) |
| Natriumcitrat                | 25 mM      |

Der Extraktionspuffer wurde in RNase-freiem Wasser hergestellt, sterilfiltriert und in aliquotierter Form bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Mit 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4) wurden die in Eppendorfreaktionsgefäße überführten Lysate versetzt und für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zugabe von 1 Volumen Phenol (pH 4,5 – 5) und 0,2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 (v/v)) erfolgte nach langsamem Auftauen der Zellen auf Eis. Nach kräftigem Schütteln und 15-minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (13.000, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ; Hettich Universal RF30; Hettich GmbH, Tuttlingen) konnte nach Phasentrennung die obere, RNA-enthaltende wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt werden. Nach einer Isopropanolfällung (1 Volumen) über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und dem Waschen der Nukleinsäure (s. Reinigung von Nukleinsäuren, Material & Methoden) wurde die RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Durch die Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  und mehrmaligem Aufziehen der Pipette wurde die Resuspendierung der RNA gefördert. Durch spektralphotometrische Bestimmung wurden die Reinheit und die Konzentration der Probe ermittelt. Nach anschließender Fällung mit Ethanol konnte die RNA mit 0,5% (w/v) SDS zu einer Konzentration von 2 µl/µl eingestellt werden. Die RNA wurde kurzfristig bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, bei längerer Aufbewahrung erfolgte die Lagerung aufgrund der RNA-Instabilität bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese mit Formaldehyd

1%ige (w/v) Agarose-Formaldehyd-Gele wurden in einer 20 x 10 cm großen Flachbettgelkammer (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Bildung von Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA sollte durch die Verwendung denaturierender Agentien wie Formaldehyd vermindert werden [Lehrach et al., 1977]. Nach der Auspolymerisierung wurde das Gel mit Laufpuffer überschichtet.

**3-Morpholinpropansulfonsäure-Puffer (10-fach konzentriert), pH 7,5**

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| 3-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS) | 0,2 M  |
| EDTA                                | 0,01 M |
| Natriumacetat                       | 0,05 M |

Da MOPS Temperatur-instabil ist, wurde dieser Puffer mit RNase-freiem Wasser hergestellt.

**Agarose-Formaldehyd-Gel**

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| Agarose                            | 1% (w/v)   |
| MOPS-Puffer (10-fach konzentriert) | 10% (v/v)  |
| Formaldehyd                        | 6,6% (v/v) |

Da MOPS Temperatur-instabil ist, wurde der MOPS-Puffer erst nach dem Erkalten des Gels auf 60°C zugegeben.

**Laufpuffer**

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| MOPS-Puffer (10-fach konzentriert) | 10% (v/v) |
| Formamid                           | 1% (v/v)  |

Die RNA-Probe (10 µg) wurde für 15 Minuten bei 56°C im RNA-Denaturierungspuffer inkubiert.

**RNA-Denaturierungspuffer**

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Formamid                            | 50% (v/v)  |
| Formaldehyd                         | 6,6% (v/v) |
| MOPS-Puffer (10-fach konzentriert)  | 10% (v/v)  |
| Ethidiumbromid-Lösung (0,125 mg/ml) | 8% (v/v)   |

Nach Untersuchungen von Kroczeck & Siebert [1990] hat die direkte Zugabe von Ethidiumbromid in den Denaturierungspuffer keinen negativen Einfluss auf die elektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA oder die nachfolgende Übertragung auf eine Membran. Durch die Zugabe von Nukleinsäure-Farbmarker wurde die Probenauftragung in die Taschen erleichtert. Zudem konnte der elektrophoretische Auftrennungsgrad der Gesamt-RNA durch die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol kontrolliert werden.

**Nukleinsäure-Farbmarker**

|                |            |
|----------------|------------|
| Glycerin       | 40% (v/v)  |
| Bromphenolblau | 0,2% (w/v) |
| Xylencyanol    | 0,2% (w/v) |
| EDTA (pH 7,0)  | 10 mM      |

Nach der Entfernung des Gelkamms wurden die Taschen des Gels mit den Proben beschickt und der Elektrophoreselauf gestartet. In 17 Stunden bei 16 V und maximaler Stromstärke wurde die Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt.

## 5.4. Überprüfung von Elektrophoreselauf und Qualität der aufgetrennten RNA

Das Gel wurde für 30 Minuten in RNase-freies Wasser gelegt, um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen, das den als Northern-Blot bezeichneten Transfer der RNA-Fragmente auf eine Nylonmembran stören könnte.

Die Mitführung eines externen Standards war nicht erforderlich, da die Gesamt-RNA von Säugetierzellen die Fraktionen der ribosomalen RNA (rRNA) als internen Standard besitzt: die Fraktionen 28 S, 18 S, 5,8 S und 5 S. Die Fraktionen 28 S (4718 Nukleotide) und 18 S (1874 Nukleotide) können aufgrund ihres hohen Anteils an der Gesamt-RNA als interner Standard

fungieren. Das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten der beiden S-rRNA-Fragmente in einer intakten RNA-Probe beträgt ungefähr 2:1. Durch die direkte Zugabe von Ethidiumbromid zu den Proben konnte unter UV-Licht (312 nm, 70%; Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) sowohl die Qualität der elektrophoretischen Auftrennung als auch die beim Transfer übertragene Menge der RNA kontrolliert werden.

## 5.5. Northern-Blot

Vor dem Transfer der RNA mittels Vakuum-Blot wurde die Nylonmembran (Hybond N; Amersham Buchler, Braunschweig) zunächst für 5 Minuten in RNase-freies Wasser gelegt. Die Äquilibration der Membran erfolgte in 20-fach konzentriertem *saline sodium citrate* (SSC)-Puffer für 20 Minuten.

### ***Saline sodium citrate* (SSC)-Puffer** (20-fach konzentriert), pH 7,0

|                |       |
|----------------|-------|
| Natriumchlorid | 3 M   |
| Natriumcitrat  | 0,3 M |

Nach den Angaben des Herstellers wurden die äquilibrierte Nylonmembran und das Gel in die Vakuum-Blot-Apparatur (VacuGene; Pharmacia LKB, Freiburg) eingelegt, der Aufbau mit RNase-freier Agarose (1% (w/v)) abgedichtet und das Gel mit 20-fach konzentriertem SSC überschichtet. Mittels Vakuum-Pumpe (Pharmacia LKB, Freiburg) wurden die aufgetrennten RNA-Fraktionen in 4 Stunden bei 65 mbar Unterdruck (Vakuum-Blot) auf die Nylonmembran transferiert. Die übertragene RNA wurde nach vorsichtigem Schwenken in 2-fach konzentriertem SSC (zur Entfernung des Hochsalzpuffers) durch 2-stündiges Backen bei 80°C auf der Membran fixiert. Durch die Betrachtung unter UV-Licht (312 nm) konnte der Erfolg des Transfers überprüft und die Lage der 28- und 18S-rRNA-Fragmente als interner Standard am Rand der Membran mit einem Bleistift markiert werden.

## 5.6. Prähybridisierung der Nylonmembran

Unspezifische Bindestellen der RNA-Sonden wurden durch eine Prähybridisierung der Membran mit 0,125 ml Formamidlösung/cm<sup>2</sup> in 1 Stunde bei 42°C im Hybridisierungssofen (Techne HB-1D, thermo-DUX, Wertheim) zur Vermeidung von Hintergrundsignalen blockiert.

### ***Saline sodiumphosphat-EDTA* (SSPE)-Puffer** (20-fach konzentriert), pH 7,5

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Natriumchlorid  | 3 M    |
| Natriumphosphat | 0,2 M  |
| EDTA            | 0,02 M |

### **Formamidlösung**

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Formamid                    | 50% (v/v) |
| Dextransulfat               | 10% (v/v) |
| SDS                         | 1% (v/v)  |
| SSPE (20-fach konzentriert) | 5% (v/v)  |

## 5.7. Strangspezifische RNA-Sonden

Für den Einsatz in der Northern-Analyse wurden ausgehend von cDNA-Fragmenten als Matrizen strangspezifische RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription hergestellt. Die Matrizen-DNA musste sich hierfür in einem Transkriptionsvektor befinden, der den Promotor der T7- bzw. der T3-RNA-Polymerase enthält, wie im Fall von pGEM-3 und pBluescript.

### ***IL-1 $\beta$ -mRNA-Sonde (Maus)***

Die in dieser Arbeit verwendete murine IL-1 $\beta$ -mRNA-Sonde wurde von Kronfeld [1998] durch die Subklonierung eines cDNA-Fragments aus dem cDNA-Plasmidkonstrukt IL-1 $\beta$ -pUC18 (R. Tönjes, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) in pBluescript KS<sup>+</sup> (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) hergestellt. Die Sequenz des 701 bp großen Fragments entspricht der Position 471 – 1164 der Maus-IL-1 $\beta$ -mRNA (GenBank *accession number* M15131) und trägt am 5'-Ende eine zusätzlich eingefügte *EcoRI*-Schnittstelle.

### ***$\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde (Huhn)***

Die Huhn- $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde enthält einer Restriktionskartierung zufolge die vollständige Sequenz der Huhn- $\beta$ -Aktin-mRNA (GenBank *accession number* L08165) von Position 1 – 1736. Als RNA-Sonde im murinen System ist die auf der Huhn- $\beta$ -Aktin-Sequenz beruhende mRNA-Sonde aufgrund einer hohen Sequenzübereinstimmung mit der murinen  $\beta$ -Aktin-mRNA geeignet. Das Plasmidkonstrukt stammt von R. Tönjes (Paul-Ehrlich-Institut, Langen).

### ***TNF $\alpha$ -mRNA-Sonde (Maus)***

Die murine TNF $\alpha$ -mRNA-Sonde wurde von einem 900 bp großen *EcoRI*-*ScaI*-Fragment einer TNF $\alpha$ -cDNA in pBluescript abgeleitet. Das Fragment trägt die vollständige Sequenz der murinen TNF $\alpha$ -mRNA (GenBank *accession number* M11731) von Position 1 – 801. Durch eine Subklonierung wurde das cDNA-Fragment aus dem cDNA-Plasmidkonstrukt TNF $\alpha$ -pBR322 (ATCC 63169) in den Transkriptionsvektor pBluescript KS<sup>+</sup> übertragen [Kronfeld, 1998].

## 5.8. Digoxigenin (DIG)-Markierung der RNA-Sonden

Zur Herstellung strangspezifischer RNA-Sonden wurden die cDNA-Plasmidkonstrukte zunächst mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen linearisiert (Tabelle 3), elektrophoretisch in einem Agarose-Gel aufgetrennt und über die *GenElute Minus EtBr spin columns* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert. Spektralphotometrisch wurde die Konzentration der aufgereinigten Nukleinsäuren ermittelt. Unter Verwendung des DIG RNA *labeling kit* (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) wurden die strangspezifischen RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription nach den Angaben des Herstellers mit Digoxigenin (DIG) markiert. Für die *in vitro*-Transkription der DIG-mRNA-Sonden für IL-1 $\beta$  und  $\beta$ -Aktin wurde die im Kit enthaltene T7-RNA-Polymerase eingesetzt. Von MBI Fermentas (GmbH; St. Leon-Rot) wurde die nicht im

Kit enthaltene T3-RNA-Polymerase bezogen, die für die Markierung der TNF $\alpha$ -mRNA-Sonde verwendet wurde. Wie vom Hersteller empfohlen, erfolgte die Überprüfung der Markierungseffizienz der Sonden (DIG User's Guide, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim).

**Tabelle 3: Die zur Herstellung der spezifischen DIG-mRNA-Sonden eingesetzten Plasmide, Restriktionsendonukleasen und RNA-Polymerasen**

| Plasmidkonstrukt                      | Linearisation mittels    | RNA-Polymerase |
|---------------------------------------|--------------------------|----------------|
|                                       | Restriktionsendonuklease |                |
| IL-1 $\beta$ -cDNA-pBluescript (Maus) | <i>EcoRI</i>             | T7             |
| TNF $\alpha$ -cDNA-pBluescript (Maus) | <i>EcoRI</i>             | T3             |
| $\beta$ -Aktin-cDNA-pGEM-3 (Huhn)     | <i>HindIII</i>           | T7             |

## 5.9. Hybridisierung der Membran

Die membran-fixierte RNA wurde mit 0,5 – 1  $\mu$ l DIG-markierter RNA-Sonde je ml Formamidlösung Nacht bei 42°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Das Volumen in der Hybridisierungsröhre betrug stets mindestens 10 ml. Durch dreimaliges, 20-minütiges Waschen der Membran bei 55, 60 und 65°C mit 0,2-fach SSC/0,1% (v/v) SDS wurde überschüssige, nicht gebundene RNA-Sonde entfernt. Unter Verwendung des DIG *Luminescent Detection Kit* (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) wurde nach den Angaben des Herstellers der Nachweis der DIG-markierten RNA-Sonde durch chemilumineszente Signale durchgeführt. Die enzymatische Dephosphorylierung des Substrats CSPD durch die alkalische Phosphatase führt zur Entstehung von Chemilumineszenz-Signalen, die Schwärzungssignale auf licht-sensitiven Filmen (Kodak BioMax Light-1; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) hinterlassen.

Durch dreimaliges Waschen (*Stripping*) der Membran mit 0,1-fach SSC/0,1% (v/v) SDS bei 95°C sollte die RNA-Sonde entfernt werden. Die Membran wurde nach kurzem Schwenken in 2-fach konzentriertem SSC mit der Huhn- $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde nach dem oben bereits erwähnten Prinzip abermals hybridisiert. Da das Gen für  $\beta$ -Aktin in Makrophagen konstitutiv exprimiert wird (*housekeeping gene*) [Contel et al., 1993], wurde eine  $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde als Kontroll-Sonde verwendet. Somit ist eine Abschätzung womöglicher Fehler durch unterschiedliche Auftragsmengen oder Konzentrationsschwankungen bei der nachfolgenden densitometrischen Auswertung möglich.



### 5.10. Densitometrische Auswertung der Northern-Analyse-Filme

Durch die Übertragung der Markierung des internen Längenstandards (28- und 18S-rRNA) auf die Filme konnten durch spezifisch erhaltene Chemilumineszenzsignale den Transkripten bestimmte Fragmentgrößen zugeordnet werden:

**Fragmentgrößen der spezifisch nachgewiesenen Transkripte**

|        |                     |
|--------|---------------------|
| 1,3 kb | IL-1 $\beta$ -mRNA  |
| 1,6 kb | TNF $\alpha$ -mRNA  |
| 1,7 kb | $\beta$ -Aktin-mRNA |

Um die Filme densitometrisch auswerten zu können, wurden sie gescannt und die jeweiligen Schwärzungsintensitäten mit Hilfe geeigneter Software (Multi-Analyst<sup>TM</sup>/PC Version 1.1; BioRad, München) bestimmt. Die densitometrischen Werte von IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -mRNA wurden auf die korrespondierenden Werte der  $\beta$ -Aktin-mRNA bezogen und das Ergebnis ohne Dimensionsangabe als IL-1 $\beta$ - bzw. TNF $\alpha$ -mRNA-Level bezeichnet.

## 6. Ermittlung der Promotor-Aktivität

Um die spezifische Promotor-Aktivität eines Gens zu untersuchen, kann man ein Reportergen unter die Kontrolle des betreffenden Gens bringen und die rekombinierte DNA mittels Transfektion in kultivierte Säugerzellen einschleusen. Für diese als Vektoren bezeichneten Reportergenkonstrukte wählt man i.d.R. Reportergene aus, die für leicht nachweisbare Enzyme, wie Luciferase oder  $\beta$ -Galactosidase, codieren. Das Reportergen unterliegt in diesen Fällen der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors. Die Expression des Reportergens hängt somit von der Promotor-Aktivität des Gens ab und ermöglicht über den Nachweis der Enzymaktivität Rückschlüsse über die entsprechende Promotor-Aktivität.

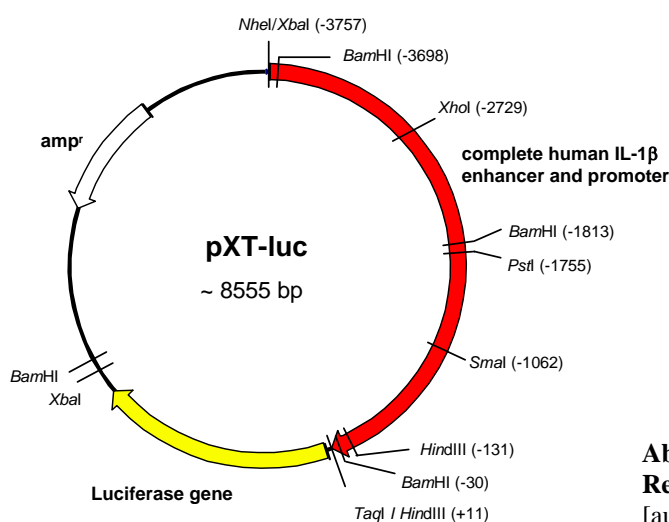
### 6.1. Promotor-Reportergen-Konstrukte

Die zu Promotor-Aktivitätsstudien verwendeten Vektoren tragen für die Selektion des rekombinierten Plasmids eine Antibiotikaresistenz und besitzen einen bakteriellen Replikationsursprung, um in *E. coli* vermehrt werden zu können.

Um die Aktivität eines Promotors in Zellen zu untersuchen, die das zugehörige Reportergen exprimieren, ist es durch die Einfügung eines Reportergens in einen Vektor und dessen Transfektion in kultivierte Säugerzellen möglich, die Kontrolle des betreffenden Promotors auf das eingeschleuste Fragment zu betrachten. Als Reportergen diente in der vorliegenden Arbeit in allen Vektoren das Luciferase-Gen, das für das einfach nachzuweisende Enzym Luciferase codiert.

### 6.1.1 Der Luciferase-Expressionsvektor pXT-luc

Der Luciferase-Expressionsvektor pXT-luc (von M.J. Fenton, Boston, University School of Medicine, USA; Abb. 15) enthält als Reportergen das Luciferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Das Gen unterliegt der Kontrolle der vollständigen *Enhancer*- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens von *Xba*I bis *Taq*I (in der Vektorzeichnung XT benannt). Die Sequenz entspricht der genomischen Sequenz des humanen IL-1 $\beta$ -Gens (*accession numbers* U265440 und X04500) von Position -3757 stromaufwärts bis +11 stromabwärts vom Transkriptionsstart. Diese Sequenz wurde aus dem Vektor pXT-CAT [Buras et al., 1994; Hatzigeorgiou et al., 1996] in den Luciferase-Expressionsvektor pGL3-basic (Promega, Madison, USA) subkloniert.



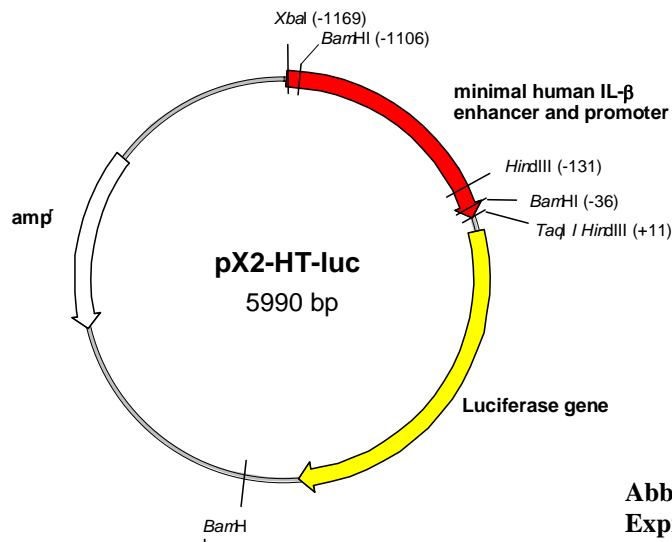
**Abb. 15: Schematische Darstellung des Reporter-genkonstruktes pXT-luc**  
[aus: D. Schilling, 2000]

Obwohl der Vektor die humane IL-1 $\beta$ -*Enhancer*- und Promotor-Region enthält, eignet er sich auch im murinen System für die Untersuchung der IL-1 $\beta$ -Promotor-Aktivität. Nach Shirakawa et al. [1993] und Buras et al. [1994] scheint die Transkriptions-Regulation von IL-1 $\beta$  in Mensch und Maus vergleichbar zu sein.

### 6.1.2. Der Luciferase-Expressionsvektor pX2-HT-luc

Anders als der Luciferase-Expressionsvektor pXT-luc besitzt der Expressionsvektor pX2-HT-luc (Abb. 16) nur die minimale *Enhancer*- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens. Die Promotor-Aktivität unterliegt der *Enhancer*-Region von *Xba*I bis *Xho*I und der verkürzten Promotor-Region von *Hind*III bis *Taq*I. Auch dieser Vektor, freundlicherweise von D. Schilling und W. Ruiner hergestellt und zum Einsatz in der vorliegenden Arbeit überlassen (2001), trägt das Gen der Leuchtkäfer-Luciferase. Konstruiert wurde der Expressionsvektor mittels PCR-Amplifikation unter Verwendung entsprechender Primer, wobei das in der Arbeitsgruppe etablierte Vektorkonstrukt pX2-HT-CAT [Buras et al., 1994] als Matrize

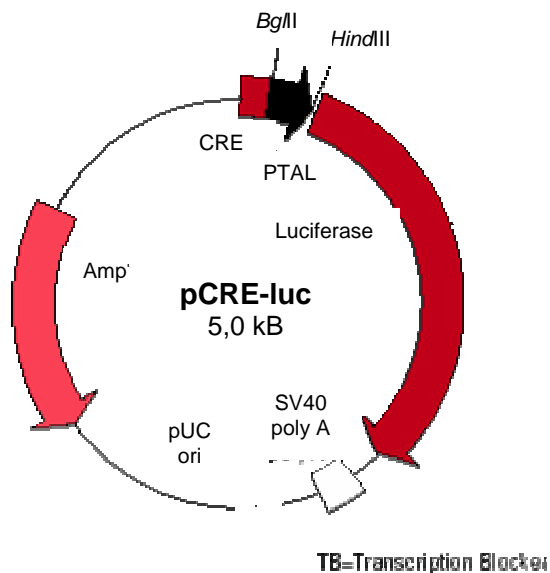
diente. Das PCR-Produkt wurde in den pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Zero Blunt TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit; Invitrogen GmbH, Karlsruhe) subkloniert. Die Restriktion des Plasmids erfolgte mit *SacI* und *NheI*. Nach elektrophoretischer Auftrennung und der Extraktion aus dem Agarose-Gel wurde das Fragment in den linearisierten Vektor pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA) ligiert.



**Abb. 16: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pX2-HT-luc**  
[aus: D. Schilling, 2000]

### 6.1.3. Der Luciferase-Expressionsvektor pCRE-luc

Wie in den beiden oben beschriebenen Reporter-genkonstrukten pXT-luc und pX2-HT-luc fungiert auch im Vektor pCRE-luc (Clontech BD Pharmingen, San José, USA; Abb. 17) das Luciferase-Gen als Reporter-gen. Anders als pXT- und pX2-HT-luc aber unterliegt dieses Gen hier nicht der Kontrolle des humanen IL-1 $\beta$ -Promotor- und *Enhancer*-Bereichs. Vielmehr sind in pCRE-luc mehrere CRE-Bindestellen an eine TATA-ähnliche Promotor-Region (PTAL) aus dem Thymidin-Kinase (TK)-Promotor des *Herpes simplex* Virus (HSV) fusioniert. Die Aktivierung des Luciferase-Gens erfolgt durch die Anlagerung des phosphorylierten Transkriptionsfaktors CREB an die multiplen CRE-Sequenzen.



**Abb. 17: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCRE-luc**  
[Clontech BD Pharmingen, San José, USA]

Der Transfektionsvektor pCRE-luc wurde bislang noch nicht vollständig sequenziert. Die angegebenen Informationen basieren auf Datenbank-Analysen, Literaturhinweisen sowie partiellen Sequenzierungen, die dem Hersteller Clontech BD Pharmingen vorlagen.

## 7. Die Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eine Säugerzelle. Man unterscheidet prinzipiell zwischen stabiler und transienter (vorübergehender) Transfektion. Integriert sich die fremde DNA in die Chromosomen der Empfängerzelle oder liegt sie als Episom vor, so ist die Transfektion stabil. Das empfangene genetische Material wird an die Tochterzellen weitergegeben. Liegt die DNA jedoch nicht im Genom eingebaut vor, so ist die Transfektion transient und umfasst nur die Zellen, die selbst unmittelbar der Transfektion unterzogen wurden. Alle Transfektionen, deren Ergebnisse hier vorliegen, waren transienter Art.

### 7.1. Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Eine der einfachsten Möglichkeiten, Reportergen-Vektoren in kultivierte Säugerzellen einzuschleusen, ist wohl die von Smith et al. [1994] beschriebene Calciumphosphat-Methode. Eine Calciumchlorid-Lösung wird hierbei mit der zu übertragenden rekombinanten DNA und einem phosphathaltigen Puffer gemischt. Es entstehen Co-Präzipitate, die über den Weg der Endocytose von den Zellen aufgenommen werden. Nach der durch Kriegler [1990] angegebenen Methode erfolgte die Herstellung der DNA-Calciumphosphat-Co-Präzipitate.

#### 7.1.1. Durchführung der Transfektion

RAW 264.7-Makrophagen wurden mit je 10 µg rekombinanter Plasmid-DNA von pXT-luc, pX2-HT-luc bzw. pCRE-luc nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Pro *well* einer 6-*well*-Platte wurden je  $1 \times 10^6$  der transfizierten Zellen ausgesät und für 5 Stunden bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Abweichend von der Beschreibung von Smith et al. [1994] wurde zur Erhöhung der Transfektions-Effizienz nur ein Glycerinschock durchgeführt; auf die Zugabe von Chloroquin wurde verzichtet. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen zur Regeneration in frischem Kulturmedium bis zum nächsten Tag kultiviert.

#### 7.1.2. Stimulierung und Inhibition der transfizierten Zellen

Gleichzeitig mit einem Mediumswechsel erfolgte die Stimulierung der Makrophagen mit 1 µg/ml LPS in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram bzw. Tautomycin für 24 Stunden. Nach dem Absaugen der Überstände und dreimaligem Waschen mit 1 ml kaltem *phosphate buffered saline* (PBS) erfolgte die Zell-Lyse durch Zugabe von 350 µl Triton / Glycylglycin-

Lysepuffer je *well* für 15 min. Nach anschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min, RT; Biofuge 13 Heraeus GmbH, Hanau) wurde der klare Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden bis zur Messung der Promotor-Aktivität auf Eis aufbewahrt, sofern die Messung unmittelbar erfolgen konnte. War dies nicht der Fall, wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Triton / Glycylglycin-Lyselösung**

|                 |           |
|-----------------|-----------|
| Glycylglycin    | 25 mM     |
| Magnesiumsulfat | 15 mM     |
| EGTA            | 4 mM      |
| Triton X-100    | 1 % (v/v) |

Kurz vor Gebrauch wurde die erforderliche Menge an Lyselösung frisch mit 1 mM Dithiothreitol (DTT) supplementiert.

## 7.2. Reportergen-Assay der Luciferase-Aktivität

Die Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* katalysiert die Oxidation von Luciferin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in Oxyluciferin. Bei dieser ATP-gekoppelten Reaktion kommt es zur Freisetzung eines Photons in Form eines Lichtblitzes der Wellenlänge 560 nm. Diese Lichtemission wurde im Luminometer (LumacR / 3M biocounterR Modell 2010, Abimed Analysetechnik GmbH, Düsseldorf) erfasst. Die Anzahl der Lichtblitze ist proportional zur Luciferase-Aktivität im jeweiligen Zell-Lysat und ermöglicht somit eine indirekte Messung der zu untersuchenden Promotor-Aktivität.

Die Messung der Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten erfolgte nach Brasier & Fortin [1995]. Zur Herstellung der Luciferin-Lösung wurde die Luciferin-Stammlösung [1 mM] mit 25 mM Glycylglycin (pH 7,8) zu einer 200  $\mu\text{M}$  Luciferin-Lösung verdünnt. Für die Messung wurden 180  $\mu\text{l}$  Assaypuffer mit 50  $\mu\text{l}$  Lysat gemischt. Sofort nach der Zugabe der Luciferin-Lösung (100  $\mu\text{l}$ ) erfolgte die Messung der Lichtemission über einen Zeitraum von 30 Sekunden.

**Assaypuffer für Luciferase-Messung**

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Glycylglycin         | 25 mM     |
| Kaliumphosphat, pH 8 | 15 mM     |
| Magnesiumsulfat      | 15 mM     |
| EGTA                 | 4 mM      |
| ATP                  | 2 mM      |
| Triton X-100         | 1 % (v/v) |

Vor Gebrauch wurde die erforderliche Menge an Assaypuffer frisch mit 1 mM DTT supplementiert.

Jede Probe wurde mindestens zweimal auf ihre Luciferase-Aktivität hin gemessen, die erhaltenen Werte gemittelt und der Hintergrundwert des Gerätes subtrahiert. Die Division der

einzelnen Luciferase-Aktivitätswerte durch den Aktivitätswert der Mediumskontrolle ergab die im Ergebnis-Teil graphisch dargestellte x-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität über dem Mediums-Hintergrund.

## **8. Statistische Methoden**

Die einzelnen Experimente wurden zum großen Teil mehrfach durchgeführt. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen ist bei den jeweiligen Versuchen entsprechend vermerkt. Die erhaltenen Werte wurden nach den Vorgaben von Cavalli-Sforza [1980] arithmetisch gemittelt und der korrespondierende Standardfehler errechnet.

## **IV. Ergebnisse**

### **1. Untersuchungen zur Regulation von IL-1 $\beta$ in RAW 264.7-Makrophagen**

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten bereits gezeigt, dass die proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  sowohl in murinen Knochenmarksmakrophagen als auch in RAW 264.7-Makrophagen differenziert reguliert werden. Durch den Einsatz von Staurosporin, einem generellen Inhibitor von Proteinkinasen [Tamaoki, 1991], konnte die Produktion des negativ regulierten IL-1 $\beta$  in murinen Knochenmarksmakrophagen bei gleichzeitiger Inhibition der TNF $\alpha$ -Bildung erhöht werden [Schilling, 2000]. Ein stimulierender Effekt von Staurosporin auf die IL-6-Produktion war von Tremblay et al. [1995] beschrieben worden.

Einige Arbeitsgruppen haben von einer cAMP-vermittelten Erhöhung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten Makrophagen durch die Zugabe des cAMP-Analogons dibutyryl-cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat (dB-cAMP) berichtet [Ohmori et al., 1990; Auron & Webb, 1994; Iwahashi et al., 2000]. Basierend auf den bekannten Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der Proteinkinase A (PKA)-Weg womöglich eine Rolle bei der differenzierten Cytokin-Regulation spielt. Ferner sollte nach Komponenten dieses Wegs gesucht werden, die einen negativen Einfluss auf die Cytokin-Bildung ausüben könnten.

Die in den vorliegenden Versuchen eingesetzte Konzentration des Endotoxins LPS betrug 1  $\mu$ g/ml. Diese Konzentration stellt eine mittlere Dosis dar, um die Cytokinproduktion anzuregen [Herzyk et al., 1992; Brauburger, 1996].

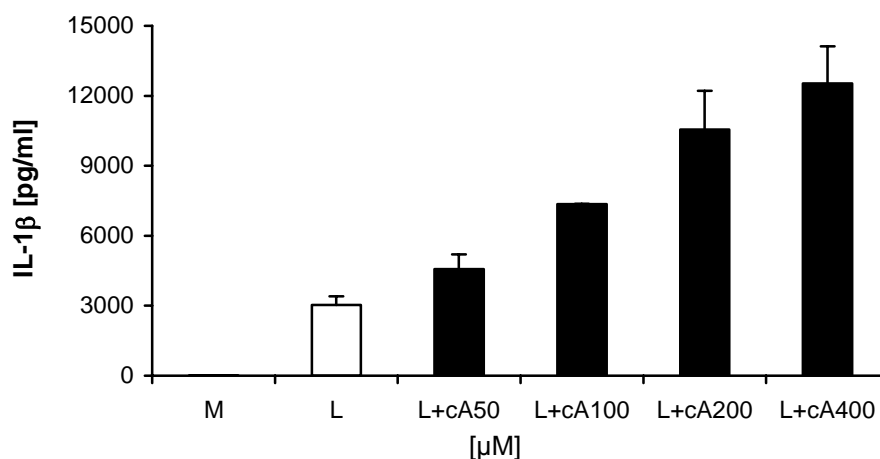
#### **1.1. Einsatz von dB-cAMP zur Modulierung der LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen**

Um weitere Informationen über die Regulation der Cytokinproduktion zu gewinnen, wurde der Effekt von cAMP auf die Cytokinproduktion LPS-stimulierter Makrophagen näher untersucht. Hierzu wurden LPS-aktivierte RAW 264.7-Makrophagen zunächst mit verschiedenen Konzentrationen des cAMP-Analogons dB-cAMP inkubiert, um die Konzentration zu ermitteln, die zu einer deutlichen Modifizierung der IL-1 $\beta$ -Produktion führt. Anschließend erfolgte die Durchführung zeitkinetischer Studien, um den Zeitpunkt der Einwirkung von cAMP festzustellen.

##### **1.1.1. Konzentrationsabhängiger Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -Produktion**

Um die Konzentration von cAMP zu ermitteln, die in Gegenwart von LPS zu einer deutlichen Änderung der negativ regulierten IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten Makrophagen führt,

wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit LPS in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Konzentrationen dB-cAMP inkubiert. Im Anschluss an die Stimulierungszeit erfolgte der Nachweis der IL-1 $\beta$ -Produktion im ELISA mit den Zell-Lysaten, da ausdifferenzierte Makrophagen im Gegensatz zu Monocyten weniger IL-1 $\beta$  sezernieren [Wewers & Herzyk, 1989]. Diese Beobachtung wurde von Schilling [2000] in murinen Knochenmarksmakrophagen bestätigt.



**Abb. 18: Konzentrations-abhängiger Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in Gegenwart verschiedener Konzentrationen dB-cAMP [ $\mu$ M] stimuliert. Der Nachweis von IL-1 $\beta$  erfolgte mittels ELISA durch die Analyse der Zell-Lysate. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: M = Medium; L = Lipopolysaccharid; cA = di-buturyl-cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat

Mit zunehmender cAMP-Konzentration stieg die produzierte IL-1 $\beta$ -Menge in LPS-aktivierten Makrophagen deutlich an (Abb. 18). Bereits die geringste in diesem Versuch verwendete Konzentration cAMP [50  $\mu$ M] erhöhte die LPS-vermittelte IL-1 $\beta$ -Produktion um das 1,5-fache gegenüber der mitgeführten LPS-Kontrolle. Die Erhöhung der Cytokinproduktion nahm bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von cAMP [400  $\mu$ M] kontinuierlich zu und verstärkte die LPS-Aktivierung um den Faktor 4,1.

### 1.1.2. Ermittlung der geeigneten dB-cAMP-Konzentration

Um in den Zellkulturexperimenten eine cAMP-Konzentration einzusetzen, die sowohl einen deutlichen Effekt auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion hat, dabei aber nicht cytotoxisch auf die Zellen wirkt, wurden Makrophagen für 24 Stunden mit LPS in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von dB-cAMP inkubiert. Zusätzlich wurden Mediums-, LPS- bzw. cAMP-Kontrolle in Abwesenheit von LPS mitgeführt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit ATP [10 mM] behandelt, das auf Makrophagen nachweislich cytotoxisch wirkt [Griffiths et al., 1995]. Die Freisetzung des intrazellulären Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein sensibler Hinweis auf eine Beschädigung der Zelle. Daher wurden im LDH-



Test die Überstände und Lysate der behandelten Makrophagen auf ihre LDH-Aktivität hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4**

Cytotoxische Wirkung von dB-cAMP auf LPS-aktivierte RAW 264.7-Makrophagen<sup>a</sup>

|            |          | LDH-Aktivität im Überstand                      |
|------------|----------|---|
|            |          | [%-Anteil an der Gesamtaktivität <sup>b</sup> ] |
| Medium     |          | 10 ± 0,5  |
| LPS        |          | 7 ± 0,5   |
| LPS + cAMP | [200 µM] | 4 ± 1,0   |
| LPS + cAMP | [500 µM] | 5 ± 1,2   |
| ATP        | [10 mM]  | 93 ± 0,6  |

<sup>a</sup> 8 x 10<sup>5</sup> RAW 264.7-Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen dB-cAMP in Gegenwart von LPS [1 µg/ml] inkubiert. Ein Ansatz wurde als Mediumskontrolle mitgeführt.

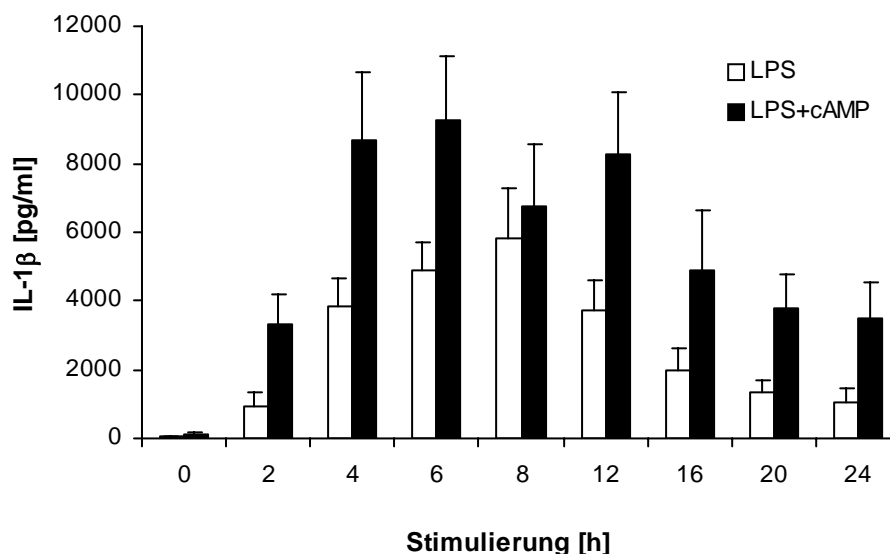
<sup>b</sup> Die LDH-Aktivität wurde in Zell-Lysaten und Überständen gemessen und der prozentuale Anteil der Aktivität im Überstand im Verhältnis zur Gesamt-Aktivität errechnet. Die Gesamt-Aktivität ist die Summe aus Aktivität in Lysat und Überstand. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Eine Cytotoxizität von dB-cAMP in den untersuchten Konzentrationen konnte aufgrund dieses Ergebnisses als unwahrscheinlich angenommen werden. Selbst die höchste, hier eingesetzte Konzentration von cAMP [500 µM] führte zu keiner Erhöhung der LDH-Aktivität im Überstand. Vielmehr scheint LPS, auch in Gegenwart von cAMP, eine zellschützende Funktion zu erfüllen, da die LDH-Aktivität im Überstand der LPS- bzw. der LPS/cAMP-behandelten Proben geringer war als in der Mediums-Kontrolle. Dieser Effekt konnte in weiteren LDH-Untersuchungen mehrfach festgestellt werden. Die mitgeführte Positivkontrolle ATP [10 mM] besaß eine deutlich cytotoxische Wirkung auf die Zellen; die LDH-Aktivität im ATP-Überstand betrug 93% der Gesamt-Aktivität.

Da der Versuch bereits bei einer Konzentration von 100 µM cAMP eine deutlich erhöhende Wirkung auf die IL-1β-Produktion in LPS-aktivierten Makrophagen gezeigt hatte (Faktor 2,4), und im LDH-Test keine cytotoxische Wirkung auf die Makrophagen selbst bei höheren Konzentrationen festgestellt werden konnte, wurde in den nachfolgenden Experimenten cAMP der Konzentration 100 µM eingesetzt.

### 1.1.3. Zeitkinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1β-Produktion

In Anlehnung an das Ergebnis zur konzentrations-abhängigen Erhöhung der IL-1β-Produktion durch cAMP sollte mit Hilfe kinetischer Studien der Zeitpunkt ermittelt werden, zu dem die Wirkung von dB-cAMP auf die Cytokinproduktion LPS-aktivierter RAW 264.7-Makrophagen einsetzt. Die Makrophagen wurden hierfür in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP für verschiedene Zeiten mit LPS stimuliert. Der Nachweis von IL-1β erfolgte unter Verwendung der Zell-Lysate mittels ELISA (Abb. 19).



**Abb. 19: Einfluss von dB-cAMP auf die LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  in RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- oder Abwesenheit von dB-cAMP [ $100 \mu\text{M}$ ] stimuliert. Der Nachweis von IL-1 $\beta$  erfolgte mittels ELISA unter Verwendung der Zell-Lysate. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus fünf unabhängigen Versuchen.

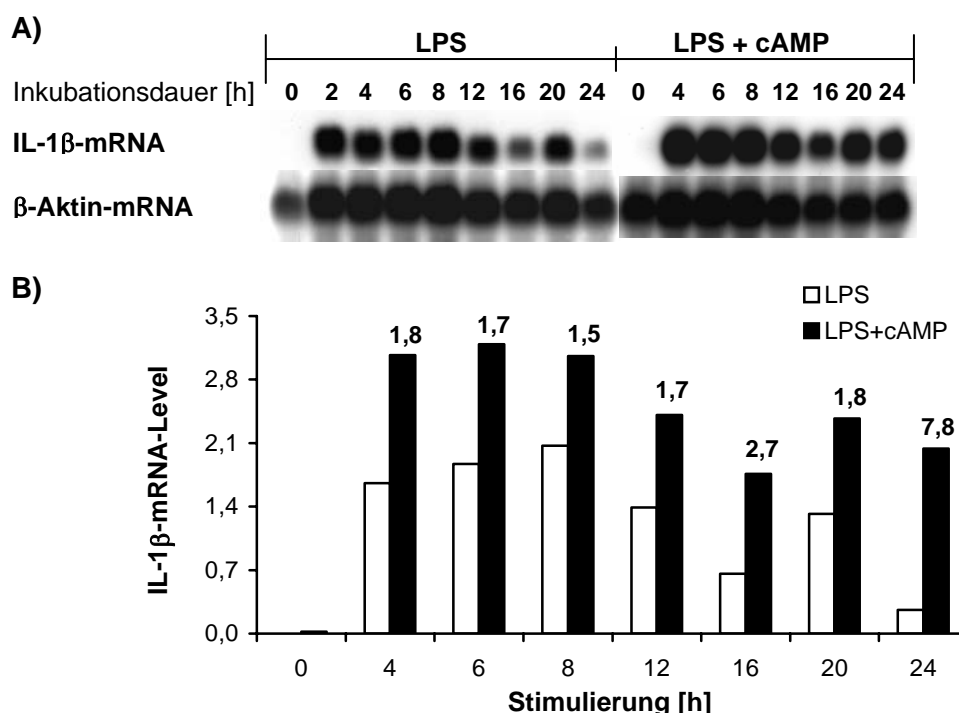
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; cAMP = dB-cAMP

Die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion nahm zwischen 2 und 8 Stunden Inkubationsdauer kontinuierlich zu, verringerte sich nach 8 Stunden jedoch wieder mit zunehmender Stimulierungszeit. Dieser als negative Regulation von IL-1 $\beta$  beschriebene Vorgang war u.a. bereits durch frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe eingehend dokumentiert worden [Schilling et al., 2001] und konnte durch die Zugabe von dB-cAMP erkennbar aufgehoben werden. Eine Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Produktion durch cAMP um den Faktor 3,5 war bereits nach 2 Stunden deutlich sichtbar und änderte sich über den Verlauf der gesamten Kinetik hinweg nur geringfügig. Der cAMP-Faktor gibt an, um das wievielfache die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen in Gegenwart von cAMP im Vergleich zu LPS-behandelten Zellen ohne cAMP erhöht wird.

#### 1.1.4. Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation

In Anlehnung an die kinetischen Studien zur Wirkung von cAMP auf die IL-1 $\beta$ -Produktion sollte desweiteren erforscht werden, ob der Einfluss von cAMP bereits auf der Ebene der Cytokin-Transkript-Akkumulation deutlich wäre. Für die Untersuchung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation wurden  $3,2 \times 10^6$  Makrophagen für verschiedene Zeiten mit LPS in An- oder Abwesenheit von cAMP stimuliert. In einer Northern-Analyse wurden je Probe  $10 \mu\text{g}$  isolierter Gesamt-RNA eingesetzt und mit DIG-markierten IL-1 $\beta$ - bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonden untersucht. Die  $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde wurde als Auftragskontrolle in einer zweiten Hybridisierungsreaktion verwendet, da das  $\beta$ -Aktin-Gen in Makrophagen konstitutiv exprimiert wird [Contel et al., 1993].

Die Ergebnisse eines Versuchs sind in Abb. 20/A exemplarisch dargestellt. Nach der densitometrischen Auswertung der auf Filmen erhaltenen Schwärzungsbanden der IL-1 $\beta$ - bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA (Abb. 20/B) wurde der densitometrische Wert der Schwärzungsbande der IL-1 $\beta$ -mRNA dividiert durch den korrespondierenden Wert der Schwärzungsbande der  $\beta$ -Aktin-mRNA. Das Verhältnis der beiden Werte ist dimensionslos und wird als IL-1 $\beta$ -mRNA-Level bezeichnet. Die Graphik repräsentiert das IL-1 $\beta$ -mRNA-Level in Relation zur jeweiligen Stimulierungszeit. Die Zahlen innerhalb des Diagramms stellen den cAMP-Faktor zu den verschiedenen Zeitpunkten der LPS-Stimulierung dar.



**Abb. 20: Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$3,2 \times 10^6$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in Gegenwart von dB-cAMP [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Jeweils  $10 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde in einer Northern-Analyse mit DIG-markierter Sonde untersucht. A) Hybridisierungsreaktion mit DIG-markierter IL-1 $\beta$ -mRNA-Sonde. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Versuchs dargestellt. B) Densitometrische Auswertung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Bande in Bezug zur korrespondierenden  $\beta$ -Aktin-mRNA. Die Zahlen über den Säulen in (B) stellen den cAMP-Faktor dar, der angibt, um das wievielfache cAMP das LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -mRNA-Level in Makrophagen erhöht. Ermittelt wird der Faktor durch das Verhältnis der mRNA-Level für IL-1 $\beta$  von LPS/cAMP gegen LPS. Bisher wurde der Versuch einmal durchgeführt.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; cAMP = di-butury-cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat

Nach Abb. 20 lag das Maximum der IL-1 $\beta$ -mRNA-Menge in LPS-aktivierten Makrophagen zwischen 6 und 8 Stunden und nahm im weiteren Verlauf deutlich und kontinuierlich ab. Die alleinige Inkubation von Zellen in Medium oder cAMP ohne LPS führte zu keiner Akkumulation der IL-1 $\beta$ -mRNA. In Gegenwart von cAMP war die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -mRNA-Menge bereits nach 4 Stunden deutlich erhöht und wurde über den gesamten Zeitverlauf des Experiments verstärkt akkumuliert. Der cAMP-Faktor nahm mit steigender

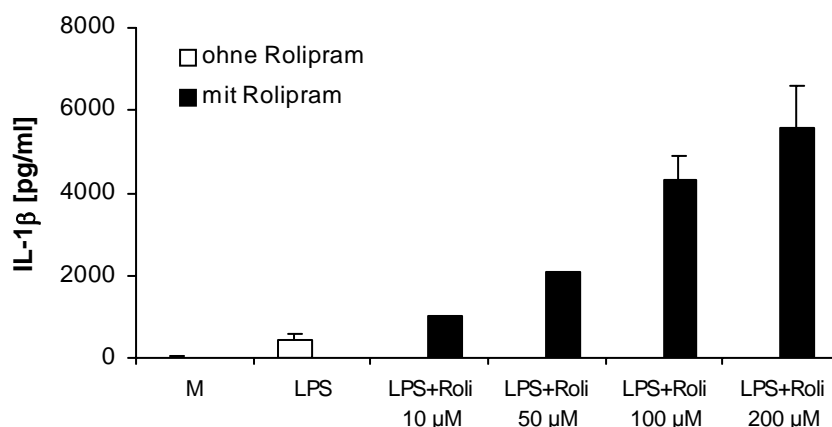
Inkubationsdauer stetig zu und erreichte nach 24 Stunden einen Wert von 7,8. Aus zeitlichen Gründen konnte dieser Versuch nur einmal durchgeführt werden. Durch dieses Ergebnis wurde jedoch die Vermutung verstärkt, dass die Negativ-Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion cAMP-gekoppelt sein könnte und die Komponenten des PKA-Wegs unter Umständen hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

## 1.2. Inhibition der Phosphodiesterase 4 zur Modulation der LPS-stimulierten IL-1 $\beta$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen

Es ist bekannt, dass das Enzym Phosphodiesterase (PDE) 4 in Makrophagen gebildet wird und cAMP in AMP umsetzen kann [Jin & Conti, 2002]. Es war daher naheliegend zu prüfen, ob dieses Enzym eine Regulationsfunktion bei der IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen ausübt. Daher wurden LPS-stimulierte Makrophagen mit Rolipram, einem spezifischen Inhibitor der PDE4, behandelt, um die Bedeutung des Enzyms bei der negativen Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion zu untersuchen. Zunächst wurde die konzentrationsabhängige Wirkung von Rolipram auf die Cytokinproduktion der Makrophagen im IL-1 $\beta$ -ELISA ermittelt.

### 1.2.1. Konzentrationsabhängiger Einfluss von Rolipram

Makrophagen wurden für 24 Stunden mit LPS in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von Rolipram inkubiert und die IL-1 $\beta$ -Produktion in den Zell-Lysaten mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt.



**Abb. 21: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für 24 Stunden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP verschiedener Konzentrationen inkubiert. Mittels ELISA wurde nach Ende der Stimulierungsdauer die IL-1 $\beta$ -Produktion in den Zell-Lysaten ermittelt. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus ein bis zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: M = Medium; LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

Mit steigender Rolipram-Konzentration nahm die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen kontinuierlich zu. Bereits die Zugabe der geringsten eingesetzten Konzentration von Rolipram [10  $\mu$ M] reichte im vorliegenden Versuch aus, um in Gegenwart von LPS die IL-1 $\beta$ -Produktion um den Faktor 2,3 zu erhöhen. Die Verstärkung der Cytokinproduktion betrug bei der Rolipram-Konzentration 50  $\mu$ M das 4,5-, bei 100  $\mu$ M das 9,5- und bei 200  $\mu$ M das 12,2-fache der IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten Zellen ohne Rolipram.

### 1.2.2. Ermittlung der geeigneten Rolipram-Konzentration

Die beiden höchsten auf ihre LPS-Verstärkung hin überprüften Rolipram-Konzentrationen wurden vor ihrem Einsatz in den Zellkulturexperimenten im LDH-Test auf ihre Cytotoxizität hin überprüft (Tabelle 5).

**Tabelle 5**

Cytotoxische Wirkung von Rolipram auf LPS-aktivierte RAW 264.7-Makrophagen<sup>a</sup>

|                |               | LDH-Aktivität im Überstand                      |
|----------------|---------------|---|
|                |               | [%-Anteil an der Gesamtaktivität <sup>b</sup> ] |
| Medium         |               | 10 $\pm$ 0,5                                    |
| LPS            |               | 7 $\pm$ 0,5                                     |
| LPS + Rolipram | [100 $\mu$ M] | 6 $\pm$ 0,9                                     |
| LPS + Rolipram | [200 $\mu$ M] | 5 $\pm$ 0,0                                     |
| ATP            | [10 mM]       | 93 $\pm$ 0,6                                    |

<sup>a</sup> 8 x 10<sup>5</sup> RAW 264.7-Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Rolipram in Anwesenheit von LPS [1  $\mu$ g/ml] inkubiert. Ein Ansatz wurde als Mediumskontrolle mitgeführt.

<sup>b</sup> Die LDH-Aktivität wurde in Lysaten und Überständen gemessen und der prozentuale Anteil der Aktivität im Überstand im Verhältnis zur Gesamt-Aktivität errechnet. Die Gesamt-Aktivität ist die Summe aus Aktivität in Lysat und Überstand. Die Ergebnisse  $\pm$  Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

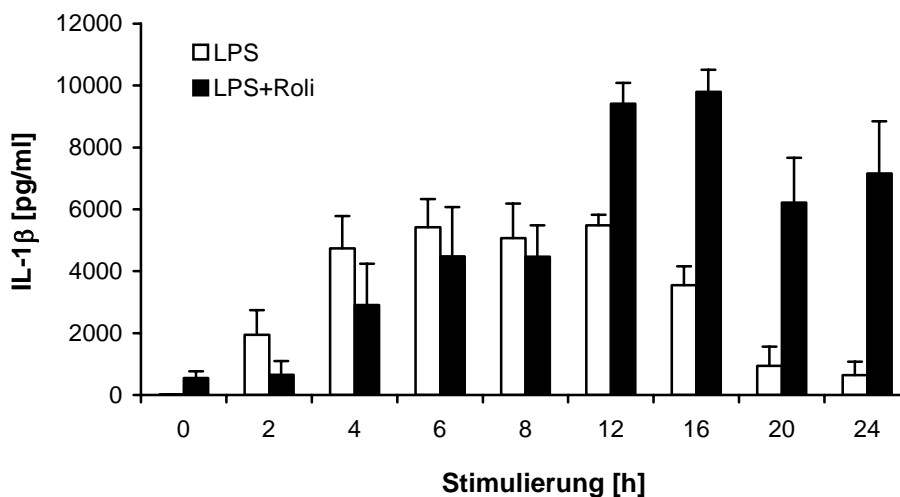
Abkürzungen: LDH = Lactatdehydrogenase; ATP = Adenosintriphosphat

Bemerkenswert an diesem Ergebnis war abermals die verringerte LDH-Aktivität im Überstand von LPS- bzw. LPS/Rolipram-behandelten Zellen im Gegensatz zur Mediumskontrolle (s. Tabelle 5). Da aufgrund des LDH-Tests für beide Rolipram-Konzentrationen eine Cytotoxizität als unwahrscheinlich angenommen werden konnte, wurde in den weiteren Versuchen Rolipram der Konzentration 100  $\mu$ M eingesetzt. Diese Konzentration reichte aus, um die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen in 24 Stunden um den Faktor 9,5 gegenüber der LPS-Kontrolle zu erhöhen.

### 1.2.3. Zeitkinetische Studien zum Einfluss von Rolipram

Für die kinetischen Studien zum Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion erfolgte die Inkubation der Makrophagen für verschiedene Zeiten mit LPS in An-

bzw. Abwesenheit von Rolipram. Mittels ELISA wurde die IL-1 $\beta$ -Produktion in den Zell-Lysaten ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22: Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

8 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- oder Abwesenheit mit Rolipram [100  $\mu$ M] inkubiert. Mittels ELISA wurde die IL-1 $\beta$ -Produktion in den Lysaten gemessen. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehlern stammen aus sechs unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

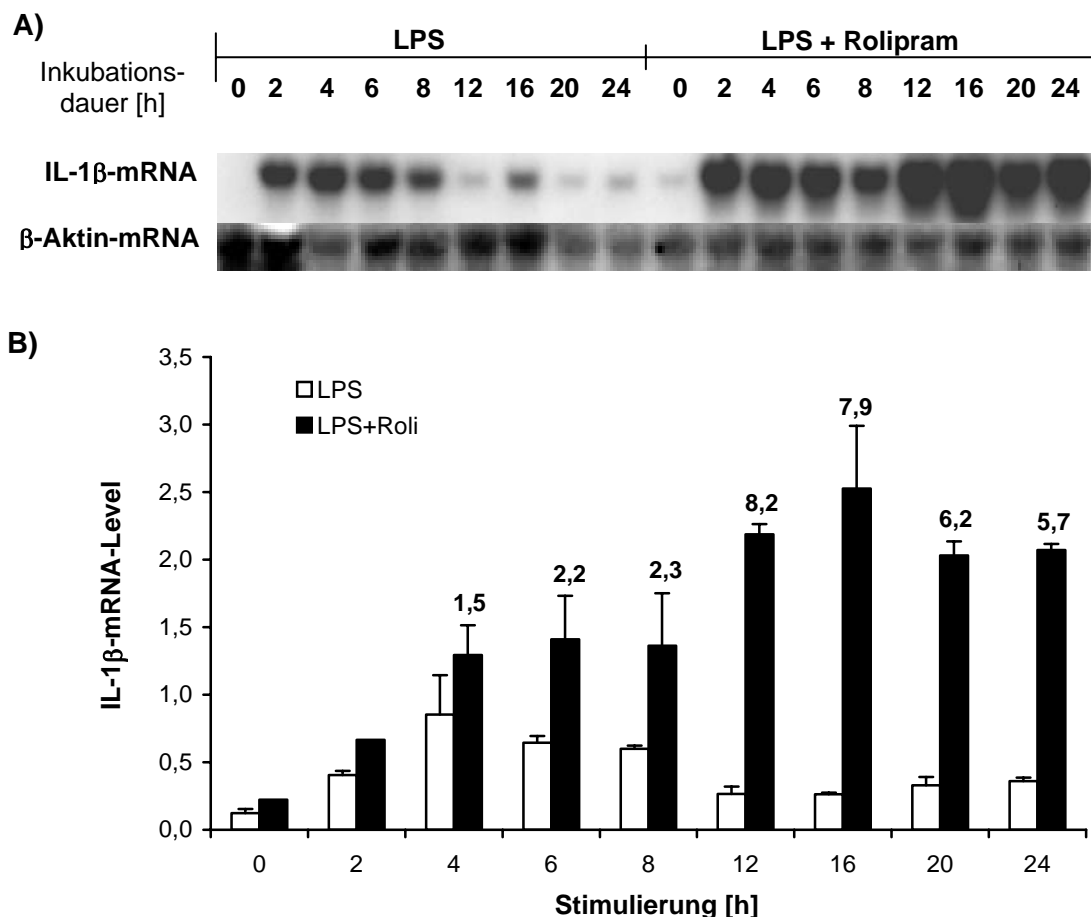
Die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion stieg bis 6 Stunden nach Inkubationsbeginn kontinuierlich an und blieb bis zum Zeitpunkt von 12 Stunden auf diesem Level. Die Gegenwart von Rolipram hatte in diesem Zeitraum keinen signifikanten Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Produktion. In Abwesenheit von LPS wurde nur eine geringe Menge IL-1 $\beta$  durch Rolipram induziert (Zeitpunkt 0). Über 12 Stunden Inkubationsdauer hinaus verringerte sich die IL-1 $\beta$ -Produktion in Abwesenheit von Rolipram aufgrund der negativen Regulation von IL-1 $\beta$ , wie bereits in früheren Versuchen gezeigt worden war. Diese negative Regulation wurde in Gegenwart von Rolipram ab einer Inkubationsdauer von 8-12 Stunden aufgehoben. Mit steigender Inkubationsdauer erhöhte sich der Rolipram-Effekt kontinuierlich und erreichte nach 24 Stunden mit 11,2-facher Erhöhung über die LPS-Kontrolle den höchsten Wert.

#### 1.2.4. Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation

Nachdem ein verstärkender Effekt von Rolipram auf die Produktion des Cytokins IL-1 $\beta$  gezeigt werden konnte, sollte geklärt werden, ob dieser Einfluss durch Rolipram bereits auf der transkriptionellen Ebene, der Ebene der mRNA-Akkumulation, erkennbar ist.

Hierfür wurden Makrophagen für verschiedene Zeiten mit LPS in An- oder Abwesenheit von Rolipram [100  $\mu$ M] stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert,

elektrophoretisch aufgetrennt und die spezifischen mRNAs für IL-1 $\beta$  sowie für die Auftragskontrolle  $\beta$ -Aktin in Northern-Analysen mittels DIG-markierter RNA-Sonden nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.



**Abb. 23: Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$3,2 \times 10^6$  Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Jeweils  $10 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde in einer Northern-Analyse mit DIG-markierter Sonde untersucht. A) Hybridisierungsreaktion mit DIG-markierter IL-1 $\beta$ -mRNA-Sonde. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Versuchs dargestellt. B) Densitometrische Auswertung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Bande in Bezug zur korrespondierenden  $\beta$ -Aktin-Bande. Die Zahlen über den Säulen in (B) stellen den Rolipram-Faktor dar, der angibt, um das wieviel-fache Rolipram das LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -mRNA-Level in Makrophagen erhöht. Ermittelt wird der Faktor durch das Verhältnis der mRNA-Level für IL-1 $\beta$  von LPS+Rolipram / LPS. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus drei unabhängigen Northern-Analysen, normiert auf eine Skala.

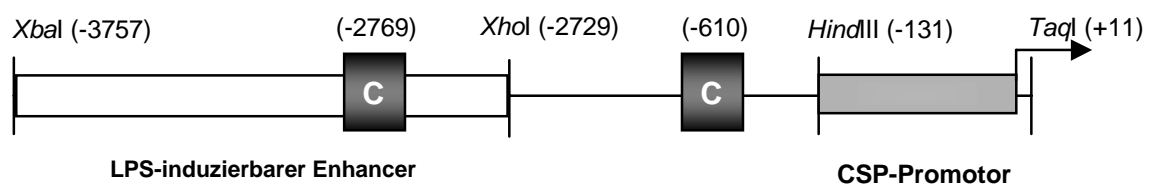
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

Auf der mRNA-Ebene verstärkte Rolipram bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten Makrophagen gegenüber der IL-1 $\beta$ -mRNA-Menge in den jeweiligen LPS-Kontrollen. Zwischen 8 und 12 Stunden jedoch nahm die durch Rolipram vermittelte Verstärkung sprunghaft von 2,3 auf das 8,2-fache zu und blieb bis zu einer Inkubationsdauer von 24 Stunden unter leichter Abnahme auf erhöhtem Niveau. Zwischen 8 und 12 Stunden scheint daher innerhalb der IL-1 $\beta$ -Regulation ein Mechanismus

eingzugreifen, dessen Auswirkungen auf die negative Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion auf der Ebene der mRNA-Akkumulation zu beobachten waren.

### 1.2.5. Einfluss von Rolipram auf die vollständige humane IL-1 $\beta$ -Enhancer-Promotor-Region

In Reporter-gen-Assays wurde der unmittelbare Einfluss des PDE4-Inhibitors Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Promotor-Aktivität untersucht. Hierfür fand zunächst ein Luciferase-Reporter-genkonstrukt Verwendung, das die vollständige *Enhancer*- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens von Position -3757 bis +11 enthielt, pXT-luc (Abb. 24).



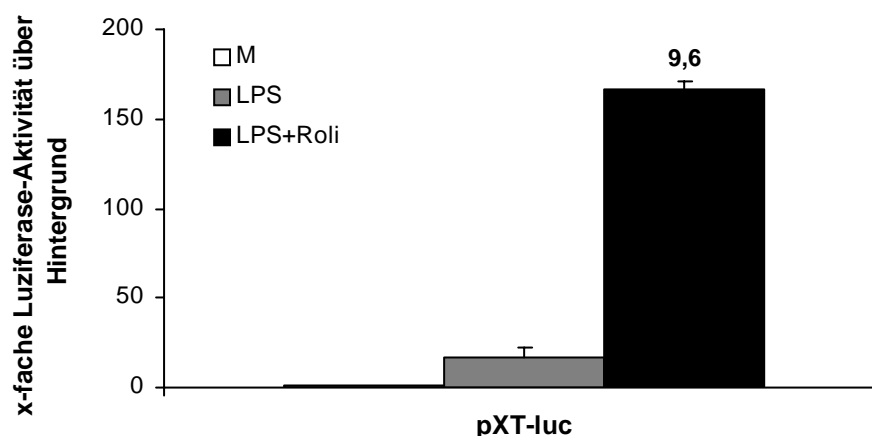
**Abb. 24: Schematischer Ausschnitt aus dem Reporter-genkonstrukt pXT-luc**

Dargestellt ist der vollständige humane IL-1 $\beta$ -*Enhancer*- und Promotorbereich von Position -3757 bis +11 (Erläuterungen siehe Text). Die Zahlen geben die Restriktionsschnittstellen von *Xba*I (-3757) bis *Taq*I (+11) an. Mit c sind die putativen CREB-Bindestellen an den Nukleinsäurepositionen -2769 bzw. -610 *upstream* des Transkriptionsstarts (Pfeil) markiert.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; CSP = *cap-site proximal*; CRE = cAMP-*response element*

Da Experimenten von Shirakawa et al. [1993] und Buras et al. [1994] zufolge die Regulation der IL-1 $\beta$ -Transkription in murinen und humanen Systemen vergleichbar zu sein scheint, wurde das Reporter-genkonstrukt pXT-luc in Transfektionsversuchen zum Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität in murinen RAW 264.7-Makrophagen eingesetzt. Die Zellen wurden transient mit dem Konstrukt pXT-luc (Abb. 15) transfiziert und die Aktivität der Luciferase, deren Bildung unter dem Einfluss des IL-1 $\beta$ -Promotors steht, im Luminometer ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 25 dargestellt.





**Abb. 25: Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte Aktivität der vollständigen humanen IL-1 $\beta$ -Enhancer- und Promotor-Region in RAW 264.7-Makrophagen**

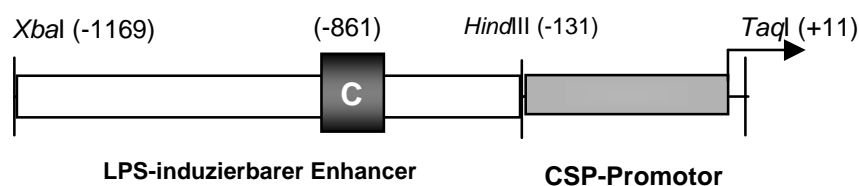
$5 \times 10^6$  Makrophagen wurden durch die Calciumphosphat-Methode mit pXT-luc transfiziert. Der Vektor besitzt die vollständige Enhancer- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- oder Abwesenheit von Rolipram [100  $\mu$ M] inkubiert. Im Anschluss an die Lyse wurde die Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten nach Zugabe des Substrats Luciferin in einem Luminometer gemessen. Die Ergebnisse zeigen die x-fache Luciferase-Aktivität über dem Hintergrund, wobei dieser die Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Zellen darstellt. Die Zahl im Diagramm repräsentiert den Rolipram-Faktor, der durch das Verhältnis aus LPS/Rolipram-induzierter Luciferase-Aktivität und LPS-induzierter Luciferase-Aktivität ohne Rolipram errechnet wurde. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram; Tau = Tautomycin

Das Luciferase-Gen, das in pXT-luc unter der Kontrolle der vollständigen Enhancer- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens steht, wurde durch die Zugabe von LPS um das 17-fache über den Hintergrund verstärkt (Abb. 25). Der Hintergrund ist die Luciferase-Aktivität, die in transfizierten, aber unstimulierten Zellen gemessen wurde. Durch die Zugabe von Rolipram allerdings wurde diese LPS-vermittelte Induktion der Promotor-Aktivität wiederum deutlich verstärkt und auf das 166-fache über den Hintergrund erhöht. Bezogen auf die LPS-vermittelte IL-1 $\beta$ -Promotor-Aktivität betrug der Rolipram-Faktor somit 9,6, d.h. in Gegenwart von LPS und Rolipram wurde die Promotor-Aktivität um diesen Wert über die induzierte Aktivität von LPS allein hinaus erhöht. Diese Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion durch PDE4 auf der Transkriptionsebene hin.

#### 1.2.6. Einfluss von Rolipram auf die minimale humane IL-1 $\beta$ -Enhancer-Promotor-Region

Da unter der Verwendung eines Vektors mit vollständiger Enhancer- und Promotorregion des humanen IL-1 $\beta$ -Gens eine deutlich verstärkende Wirkung von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität festgestellt werden konnte, sollte in nachfolgenden Experimenten versucht werden, die Bereiche der Promotorregion, die an der Vermittlung der negativen Regulation der IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität und des Rolipram-Effektes beteiligt sind, näher zu bestimmen.

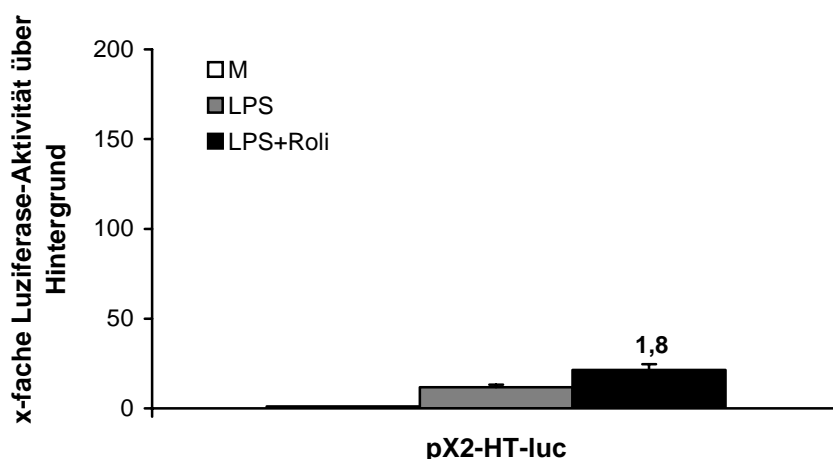


**Abb.: 26: Schematischer Ausschnitt aus dem Reportergenkonstrukt pX2-HT-luc**

Dargestellt sind der humane IL-1 $\beta$ -*Enhancer*-Bereich sowie der minimale Promotorbereich von Position -1169 bis +11 (Erläuterungen siehe Text). Die Zahlen geben die Restriktionsschnittstellen von *Xba*I (-1169) bis *Taq*I (+11) an. Durch *c* ist die putative CRE-Sequenz im LPS-induzierbaren *Enhancer* gekennzeichnet.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; CSP = *cap-site proximal*; c = cAMP-response element

RAW 264.7-Makrophagen wurden mit dem Reportergenkonstrukt pX2-HT-luc (Abb. 16) transfiziert, das die minimale *Enhancer*- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens von Position -3757 bis -2729 trägt (vgl. Abb. 24 und 26).



**Abb. 27: Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte Aktivität der minimalen humanen IL-1 $\beta$ -*Enhancer*- und Promotor-Region in RAW 264.7-Makrophagen**

5 x 10<sup>6</sup> Makrophagen wurden durch die Calciumphosphat-Methode mit pX2-HT-luc transfiziert. Der Vektor besitzt die LPS-induzierbare *Enhancer*-Region sowie die minimale Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram [100  $\mu$ M] inkubiert. Nach der Lyse wurde die Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten nach Zugabe des Substrats Luciferin im Luminometer ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die x-fache Luciferase-Aktivität über dem Hintergrund, der die Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Zellen darstellt. Die Zahl im Diagramm repräsentiert den Rolipram-Faktor, der angibt, um das wievielfache Rolipram die IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität erhöht. Errechnet wird er durch das Verhältnis aus LPS/Rolipram-induzierter Luciferase-Aktivität und LPS-induzierter Luciferase-Aktivität in Abwesenheit von Rolipram. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stellen das Ergebnis aus vier unabhängigen Versuchen dar.

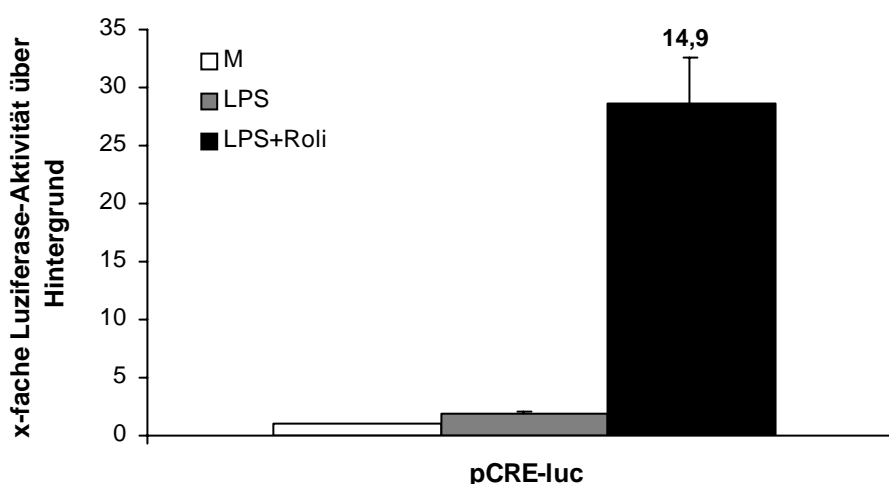
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

Nach den Ergebnissen in Abb. 27 induzierte LPS in pX2-HT-luc-transfizierten Makrophagen eine 12-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität über den Hintergrund. Die Zugabe von

Rolipram verstärkte die LPS-induzierte Promotoraktivität verhältnismäßig schwach um den Faktor 1,8. Die Erhöhung der LPS-induzierten Aktivität des minimalen IL-1 $\beta$ -Promotorbereichs durch Rolipram war im Gegensatz zu Versuchen mit der vollständigen Promotorregion in pXT-luc somit deutlich verringert. Die fehlende Region scheint daher eine wesentliche Rolle bei der negativen Kontrolle durch PDE4 zu spielen.

### 1.2.7. Einfluss von Rolipram auf die Promotor-Aktivierung im Expressionsvektor pCRE-luc

Der direkte Einfluss des PDE-Inhibitors auf die Phosphorylierung von CREB sollte in einem weiteren Versuch gezeigt werden. Das Reportergenkonstrukt pCRE-luc enthält multiple, dem Luciferase-Gen *upstream* vorangestellte CRE-Sequenzen, an die nur phosphoryliertes CREB anlagern kann. Ohne die Anlagerung des phosphorylierten Transkriptionsfaktors bleibt eine Aktivierung des Promotors und die damit verbundene Luciferase-Aktivität aus. RAW 264.7-Makrophagen wurden mit pCRE-luc transient transfiziert und die Luciferase-Aktivität im Luminometer ermittelt (Abb. 28).



**Abb. 28: Einfluss von Rolipram auf den CREB-abhängigen Promotor im Reportergenkonstrukt pCRE-luc**

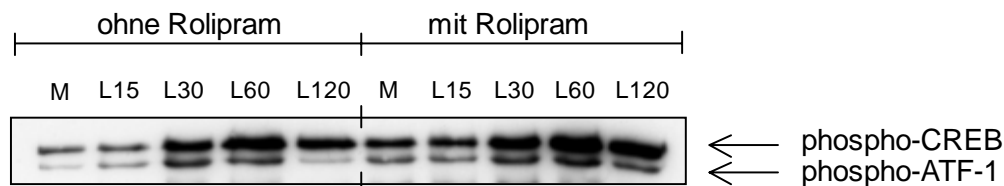
5 x 10<sup>6</sup> Makrophagen wurden mittels Calciumphosphat-Methode mit dem Reportergenkonstrukt pCRE-luc transfiziert. Der Vektor enthält dem Promotor-Bereich mehrere in Folge vorgeschaltete CRE-Sequenzen, an die phosphoryliertes CREB-Protein binden kann. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram [100  $\mu$ M] inkubiert. Nach der Lyse erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten nach Zugabe des Substrats Luciferin in einem Luminometer. Das Ergebnis zeigt die x-fache Luciferase-Aktivität über dem Hintergrund, wobei dieser die Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Zellen darstellt. Die Zahl innerhalb des Diagramms repräsentiert den Rolipram-Faktor, der die Erhöhung der LPS-induzierten Promotoraktivität durch Rolipram darstellt. Ermittelt wird er durch das Verhältnis LPS/Rolipram-induzierter Luciferase-Aktivität zu LPS-induzierter Luciferase-Aktivität ohne Rolipram. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardfehlern.

Abkürzungen: M = Medium; LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

Die Promotoraktivität im Reportergenkonstrukt pCRE-luc wurde durch LPS um das 2-fache über den Hintergrund erhöht. Als Hintergrund ist die Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber nicht stimulierten Makrophagen bezeichnet. Wurden die transfizierten Zellen mit LPS in Anwesenheit von Rolipram stimuliert, so erhöhte sich die induzierte Promotoraktivität auf das 29-fache über den Hintergrund. Der Rolipram-Effekt betrug 14,9 gegenüber LPS-stimulierten Zellen in Abwesenheit von Rolipram.

### 1.2.8. Western-Analyse zum Einfluss von Rolipram auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB

Es wurde vermutet, dass der Rolipram-vermittelte Effekt auf die IL-1 $\beta$ -Synthese auf einer verstärkten Aktivierung beteiligter Transkriptionsfaktoren beruhen könnte. Da der Transkriptionsfaktor CREB als essentiell für die Expression des Cytokins IL-1 $\beta$  beschrieben wurde [Auron & Webb, 1994], wurden für Untersuchungen zum Einfluss von Rolipram auf die Phosphorylierung von CREB Gesamtzell-Lysate hergestellt. Die Makrophagen waren hierfür in An- oder Abwesenheit von Rolipram inkubiert worden. Die Lysate wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und in Western-Analysen durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers qualitativ auf die Menge an phosphoryliertem CREB hin untersucht (Abb. 29).



**Abb. 29: Western-Analyse zum Einfluss von Rolipram auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB in RAW 264.7-Makrophagen**

$4 \times 10^6$  Makrophagen wurden zwischen 15 und 120 Minuten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- oder Abwesenheit von Rolipram [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Die mitgeführten Medium- und Rolipram-Kontrollen wurden 120 Minuten inkubiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte die Auftragung gleicher Proteinmengen. Danach wurden die Proteinextrakte in einer Western-Analyse mit einem spezifischen pCREB-Antikörper, der am Serin-Rest 133 phosphoryliertes CREB erkennt, untersucht. Zusätzlich detektiert der Antikörper phosphoryliertes ATF-1, einen weiteren Transkriptionsfaktor. Die Fragmentgröße von pCREB beträgt 43 kDa und konnte anhand eines mitgeführten Standards in Vorversuchen identifiziert werden. Durch den Antikörper wird das CREB-verwandte Protein ATF-1 ebenfalls detektiert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

Abkürzungen: M = Medium; L = Lipopolysaccharid; CREB = cAMP-response element binding protein

Das Ergebnis in Abb. 29 zeigt, dass die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB bereits nach 30 Minuten LPS-Inkubationszeit anstieg, einen Maximalwert nach 60 Minuten erreichte und dann bis 120 Minuten wieder abnahm. Unter Zugabe von Rolipram war das Phosphorylierungslevel von CREB zu allen untersuchten Zeitpunkten höher als in den nur mit

LPS-behandelten Zellen. Bereits nach 15 Minuten konnte mit Hilfe der Western-Analyse eine deutliche Zunahme der Menge an phosphoryliertem CREB im Gesamtzell-Lysat nachgewiesen werden. Wie bereits in den Zell-Lysaten der LPS-stimulierten Makrophagen lag das Maximum der Phosphorylierung in den Lysaten der LPS/Rolipram-behandelten Makrophagen bei 60 Minuten. Die verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors durch den Einsatz von Rolipram blieb bis zur Stimulierungsdauer von 120 Minuten erhalten. Rolipram scheint einen unmittelbaren Effekt auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB auszuüben.

### 1.3. Inhibition der Proteinphosphatase 1 zur Modulierung der IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen

#### 1.3.1. Ermittlung der geeigneten Tautomycin-Konzentration

Die erhöhende Wirkung des Serin/Threonin-Proteinphosphatase (PP) 1-Inhibitors Tautomycin auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen hatte Schilling [2000] in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits gezeigt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde schon zu diesem Zeitpunkt eine Beteiligung von Proteinphosphatasen an der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  vermutet. In wieweit Tautomycin als spezifischer Inhibitor der PP1 (> PP2A) [MacKintosh & Klumpp, 1990] die Produktion von IL-1 $\beta$  sowie der proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF $\alpha$  beeinflusst, sollte untersucht werden.

Schilling [2000] hatte Knochenmarksmakrophagen in Gegenwart von LPS mit steigenden Konzentrationen von Tautomycin für 24 Stunden inkubiert. Bei Verwendung von 500 nM Tautomycin betrug die Verstärkung der LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion das 1,7-fache der LPS-Kontrolle. Um einen cytotoxischen Effekt von Tautomycin auf RAW 264.7-Makrophagen ausschließen zu können, wurden diese für 24 Stunden mit LPS in Gegenwart der Tautomycin-Konzentrationen 500 und 750 nM inkubiert, um die Kulturüberstände und Lysate in LDH-Tests einzusetzen (Tabelle 6). Zusätzlich wurden eine Mediums-, eine LPS-Kontrolle ohne Inhibitor sowie eine Positivkontrolle [ATP; 10 mM] mitgeführt.

**Tabelle 6**

#### **Cytotoxische Wirkung von Tautomycin auf LPS-aktivierte RAW 264.7-Makrophagen<sup>a</sup>**

|                  |                | LDH-Aktivität im Überstand<br>[%-Anteil an der Gesamtaktivität <sup>b</sup> ] |
|------------------|----------------|---|
| Medium           |                | 10 $\pm$ 0,5  |
| LPS              | [1 $\mu$ g/ml] | 7 $\pm$ 0,5   |
| LPS + Tautomycin | [500 nM]       | 4 $\pm$ 1,0   |
| LPS + Tautomycin | [750 nM]       | 5 $\pm$ 1,2   |
| ATP              | [10 mM]        | 93 $\pm$ 0,6  |

<sup>a</sup> 8 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Tautomycin in Anwesenheit von LPS [1  $\mu$ g/ml] inkubiert. Ein Ansatz wurde als Mediumskontrolle mitgeführt.

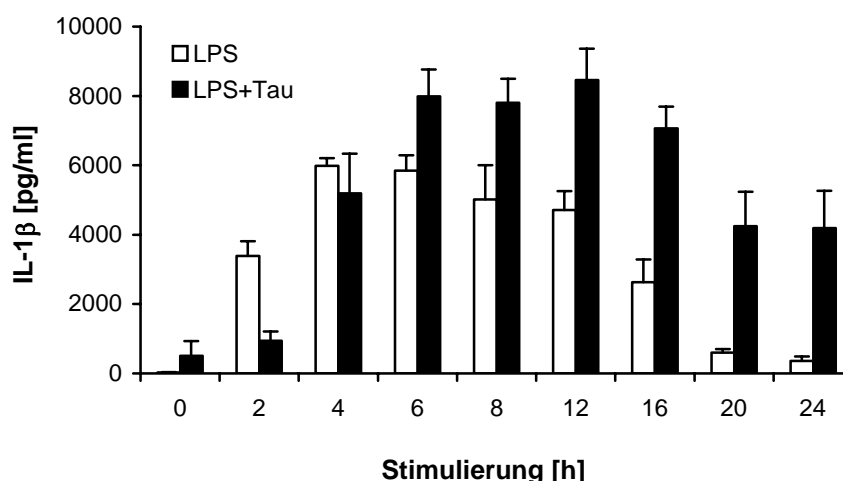
<sup>b</sup> Die LDH-Aktivität wurde in Lysaten und Überständen der Makrophagenkulturen gemessen und der prozentuale Anteil der Aktivität im Überstand im Verhältnis zur Gesamt-Aktivität errechnet. Die Gesamt-Aktivität ist die Summe aus Aktivität in Lysat und Überstand. Die Ergebnisse  $\pm$  Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: LDH = Lactatdehydrogenase; LPS = Lipopolysaccharid; ATP = Adenosintriphosphat

Die LDH-Aktivität im Überstand der mit LPS in Anwesenheit der beiden Tautomycin-Konzentrationen 500 und 750 nM stimulierten Zellen war gegenüber der Mediumskontrolle verringert. Wie bereits bei früheren LDH-Untersuchungen wurde ein LPS-vermittelter zellschützender Effekt vermutet. Eine Cytotoxizität konnte aufgrund der geringen LDH-Aktivitäten in den Überständen für die untersuchten Konzentrationen ausgeschlossen werden. In den weiteren Zellkulturexperimenten wurde daher Tautomycin der Konzentration 500 nM eingesetzt.

### 1.3.2. Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -Produktion

Der PP-Inhibitor Tautomycin ist dafür bekannt, PP1 spezifischer zu inhibieren als PP2A oder 2B. Da durch Vorarbeiten von Schilling [2000] vermutet werden konnte, dass die PP1 bei der negativen Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion eine Rolle spielt, wurde der spezifische PP1-Inhibitor Tautomycin in Zeitkinetik-Studien eingesetzt (Abb. 30).



**Abb. 30: Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [500 nM] stimuliert. Der Nachweis von IL-1 $\beta$  erfolgte in den Zell-Lysaten mittels ELISA. Die Ergebnisse stellen die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus sieben unabhängigen Versuchen dar.

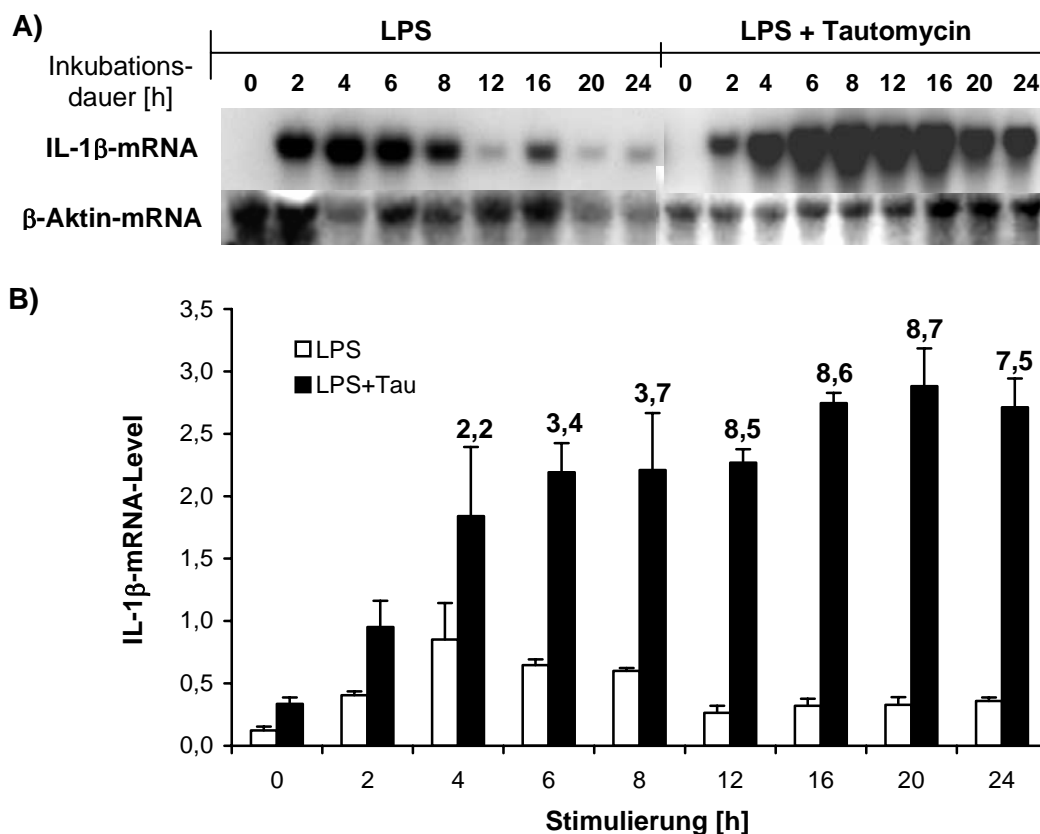
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

Bis zu einer Inkubationszeit von 4 Stunden hatte die Anwesenheit von Tautomycin in LPS-stimulierten Makrophagen keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Produktion. Die LPS-induzierte Proteinmenge wurde durch Tautomycin nach 6 Stunden Inkubationsdauer um das 1,4-fache erhöht, wobei diese Verstärkung mit zunehmendem Stimulierungszeitraum anstieg und nach 24 Stunden mit einem Tautomycin-Faktor von 14,4 ihren Maximalwert erreichte. Der Tautomycin-Faktor ist der x-fache Wert, um den Tautomycin die LPS-induzierte Cytokin-Produktion gegenüber der LPS-Kontrolle erhöht. Bemerkenswert war die sprunghaft

ansteigende Tautomycin-vermittelte Verstärkung der IL-1 $\beta$ -Produktion zwischen 16 und 20 Stunden auf. Der Tautomycin-Faktor erhöhte sich innerhalb dieses Inkubationszeitraums von 2,9 nach 16 Stunden auf 9,8 nach 20 Stunden. Tautomycin verstärkte somit die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen bereits ab einer Inkubationsdauer von 6 Stunden, hob die negative Regulation von IL-1 $\beta$  durch die Inhibition der PP1 am deutlichsten aber erst relativ spät nach 20 bzw. 24 Stunden auf.

### **1.3.3. Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation**

In weitergehenden Untersuchungen sollten der Einfluss von Tautomycin auf die mRNA-Akkumulation von IL-1 $\beta$  gezeigt werden. Wie unter Material & Methoden beschrieben wurden RAW 264.7-Makrophagen für verschiedene Zeiten mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin inkubiert. 10  $\mu$ g der Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die IL-1 $\beta$ -mRNA- bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA-Fragmente mittels spezifischer RNA-Sonden in Northern-Analysen detektiert (Abb. 31/A). Durch densitometrische Auswertungen wurde das IL-1 $\beta$ -Level ermittelt (Abb. 31/B).



**Abb. 31: Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$3,2 \times 10^6$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [ $500 \text{ nM}$ ] inkubiert. Jeweils  $10 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurde in einer Northern-Analyse mit DIG-markierter Sonde untersucht. A) Hybridisierungsreaktion mit DIG-markierter IL-1 $\beta$ -mRNA-Sonde. Exemplarisch ist das Ergebnis eines Versuchs dargestellt. B) Densitometrische Auswertung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Bande in Bezug zur korrespondierenden  $\beta$ -Aktin-Bande. Die Zahlen im Diagramm (B) stellen den Tautomycin-Faktor dar, der angibt, um das wieviel-fache Tautomycin das LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -mRNA-Level in Makrophagen erhöht. Ermittelt wird der Faktor durch das Verhältnis der mRNA-Level für IL-1 $\beta$  von LPS/Tautomycin gegen LPS. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus zwei bis drei unabhängigen Northern-Analysen, normiert auf eine Skala.

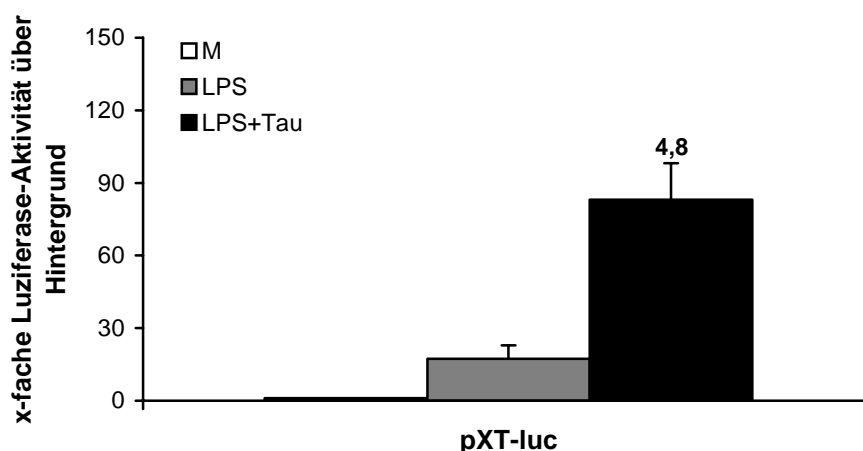
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

Die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation erreichte in diesem Experiment ihren Maximalwert nach einer Stimulierungsdauer von 4 Stunden und nahm danach kontinuierlich auf ein erniedrigtes Level ab, das zwischen 12 und 24 Stunden nahezu unverändert blieb. Tautomycin zeigte in Gegenwart von LPS bereits unmittelbar nach Stimulierungsbeginn einen verstärkenden Effekt auf die Akkumulation der IL-1 $\beta$ -mRNA. Der Tautomycin-Faktor nahm zwischen 4 und 8 Stunden von 2,2 auf einen Wert von 3,7 zu, stieg danach (ab 12 Stunden) aber sprunghaft auf einen deutlich erhöhten Wert von 8,5 an. Der Tautomycin-Faktor gibt die x-fache Erhöhung des LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Levels in Gegenwart von Tautomycin gegenüber der LPS-Kontrolle an. Diese deutliche Verstärkung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in Gegenwart von Tautomycin zwischen 8 und 12 Stunden lässt vermuten, dass der PP1-Inhibitor Tautomycin maßgeblich in diesem Zeitraum die negative Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion moduliert.



### 1.3.4. Einfluss von Tautomycin auf die vollständige humane IL-1 $\beta$ -Enhancer- und Promotorregion

In Reporter-gen-Assays wurde untersucht, ob Tautomycin bereits auf transkriptioneller Ebene einen modulierenden Einfluss auf die Aktivität eines IL-1 $\beta$ -abhängigen Promotors vermittelt. Das Luciferase-Reporter-genkonstrukt pXT-luc trägt den vollständigen *Enhancer*- und Promotorbereich des humanen IL-1 $\beta$ -Gens. RAW 264.7-Makrophagen wurden mit pXT-luc transfiziert und für 24 Stunden mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin stimuliert. Die Promotor-abhängige Aktivität der Luciferase wurde im Luminometer ermittelt. In Abb. 32 ist das Ergebnis dargestellt.



**Abb. 32: Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte Aktivität der vollständigen humanen IL-1 $\beta$ -Enhancer- und Promotor-Region in RAW 264.7-Makrophagen**

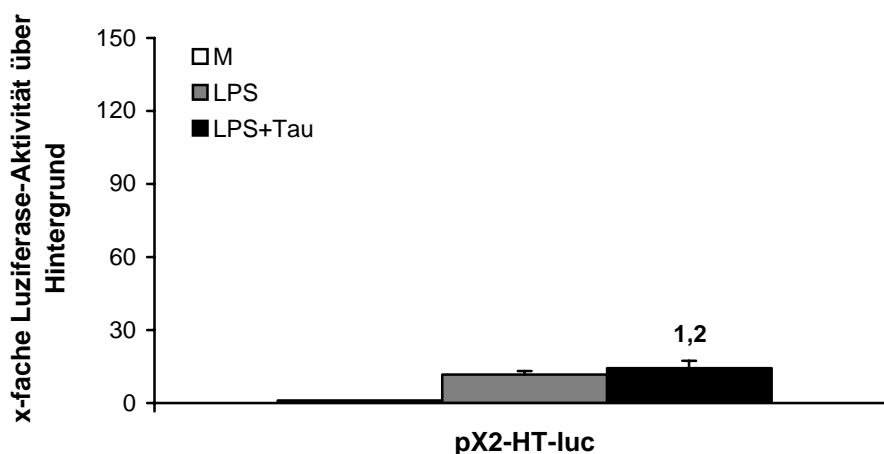
5 x 10<sup>6</sup> Makrophagen wurden mittels Calciumphosphat-Methode mit pXT-luc transfiziert. Der Vektor enthält die vollständige *Enhancer*- und Promotor-Region des humanen IL-1 $\beta$ -Gens. Die transfizierten Zellen wurden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [500 nM] für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Lyse wurde die Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten nach Zugabe des Substrats Luciferin in einem Luminometer ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die x-fache Luciferase-Aktivität über dem Hintergrund, wobei dieser die Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Zellen darstellt. Die Zahl oberhalb des Balkens stellt den Tautomycin-Faktor dar, der die Tautomycin-vermittelte Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität in Gegenwart von LPS gegenüber LPS-induzierter IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität ohne Inhibitor darstellt. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: M = Medium; LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

Die Zugabe von LPS führte in pXT-luc zu einer 17-fachen Erhöhung der Promotor-Aktivität über dem Hintergrund. Als Hintergrund ist die Luciferase-Aktivität definiert, die in transfizierten, aber unstimulierten Zellen gemessen wurde. In Gegenwart von Tautomycin wurde die LPS-induzierte Verstärkung der Promotor-Aktivität auf das 83-fache gegenüber dem Hintergrund erhöht. Der Tautomycin-Faktor, der die x-fache Erhöhung der LPS-induzierten Promotor-Aktivität in Gegenwart von Tautomycin im Vergleich zur LPS-Kontrolle angibt, betrug 4,8. Der PP1-Inhibitor Tautomycin kann somit als potenter Verstärker der humanen IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen bezeichnet werden.

### 1.3.5. Einfluss von Tautomycin auf die minimale humane IL-1 $\beta$ -Enhancer-Promotor-Region

Welche Bereiche der Promotorregion für die Tautomycin-vermittelte Aufhebung der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  von Bedeutung sind, sollte durch weiterführende Promotoranalysen untersucht werden. Hierfür stand das Reportergenkonstrukt pX2-HT-luc zur Verfügung, das die LPS-induzierbare *Enhancer*- und die minimale Promotorregion des humanen IL-1 $\beta$ -Gens enthält (Abb. 33).



**Abb. 33: Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte Aktivität der minimalen humanen IL-1 $\beta$ -Enhancer- und Promotorregion in RAW 264.7 Makrophagen**

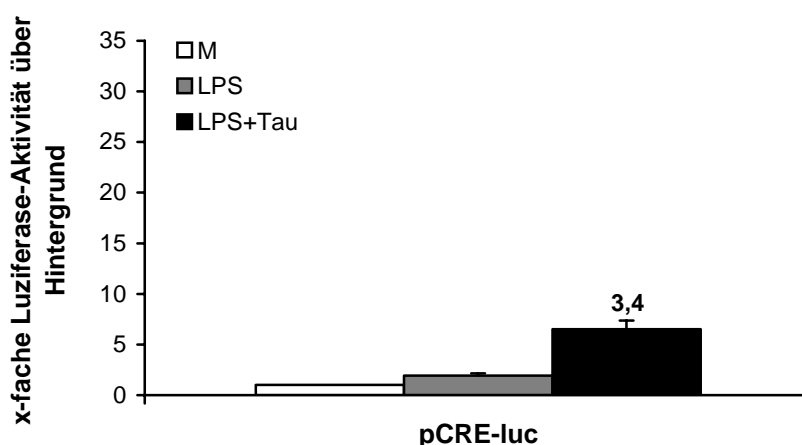
5 x 10<sup>6</sup> Makrophagen wurden durch die Calciumphosphat-Methode mit pX2-HT-luc transfiziert. Dieser Vektor enthält den LPS-induzierbaren *Enhancer*- sowie die minimale Promotorregion des humanen IL-1 $\beta$ -Gens. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- oder Abwesenheit von Tautomycin [500 nM] inkubiert. Im Anschluss an die Lyse wurde die Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten nach Zugabe des Substrats Luciferin in einem Luminometer ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die x-fache Luciferase-Aktivität über dem Hintergrund, wobei dieser die Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Zellen darstellt. Die Zahl innerhalb des Diagramms stellt den Tautomycin-Faktor dar, der angibt, um das wievielfache Tautomycin die IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität gegenüber der LPS-induzierten Aktivität in Abwesenheit von Tautomycin erhöht. Die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler stammen aus vier unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: M = Medium; LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

Bei pX2-HT-luc führte die Stimulierung mit LPS zu einer 12-fachen Verstärkung der Promotoraktivität gegenüber dem Hintergrund, der durch die Messung der Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Makrophagen ermittelt wurde. In Gegenwart von Tautomycin erhöhte sich die LPS-induzierte Promotoraktivität unwesentlich. Der Faktor, um den Tautomycin die IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität erhöhte, betrug lediglich 1,2 in Bezug auf die LPS-Kontrolle. Der PP1-Inhibitor Tautomycin übt somit auf die minimale Promotorregion des humanen IL-1 $\beta$ -Gens keinen Einfluss aus. Die im Konstrukt pX2-HT-luc entfernte Sequenz zwischen dem *Enhancer* und dem minimalen Promotor scheint daher von essentieller Bedeutung bei der Regulation der IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität zu sein.

### 1.3.6. Einfluss von Tautomycin auf die Promotoraktivität in pCRE-luc

Durch die Verwendung des Reportergenkonstruktes pCRE-luc wurde auf anderem Wege untersucht, ob Tautomycin die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB unmittelbar verstärkt. Makrophagen wurden transient mit pCRE-luc transfiziert und die Luciferase-Aktivität im Luminometer ermittelt (Abb. 34).



**Abb. 34: Einfluss von Tautomycin auf den CREB-abhängigen Promotor im Reportergenkonstrukt pCRE-luc**

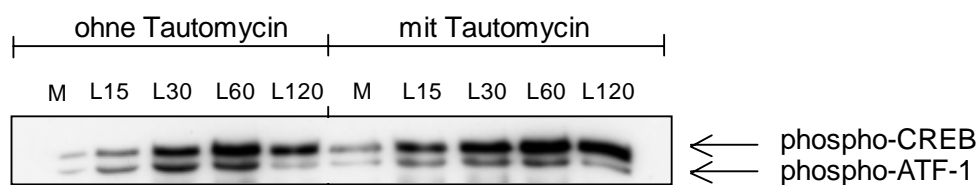
$5 \times 10^6$  Makrophagen wurden mittels Calciumphosphat-Methode mit dem Reportergenkonstrukt pCRE-luc transfiziert. Der Vektor enthält dem Promotor-Bereich mehrere in Folge vorgeschaltete CRE-Sequenzen, an die phosphoryliertes CREB-Protein binden kann. Die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [ $500 \text{ nM}$ ] inkubiert. Nach der Lyse erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität in den Zell-Lysaten nach Zugabe des Substrats Luciferin in einem Luminometer. Das Ergebnis zeigt die x-fache Luciferase-Aktivität über dem Hintergrund, wobei dieser die Luciferase-Aktivität in transfizierten, aber unstimulierten Zellen darstellt. Die Zahl oberhalb des Balkens repräsentiert den Tautomycin-Faktor, der die Erhöhung der Promotoraktivität durch Tautomycin darstellt. Ermittelt wird er durch das Verhältnis LPS/Tautomycin-induzierter Luciferase-Aktivität zu LPS-induzierter Luciferase-Aktivität ohne Tautomycin. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: M = Medium; LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

In Gegenwart von LPS führte Tautomycin zu einer 3,4-fachen Erhöhung der Promotor-Aktivität in pCRE-luc transfizierten Makrophagen gegenüber der Promotor-Aktivität in LPS-stimulierten Zellen. Durch Western-Analysen (Abb. 36) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Tautomycin in LPS-stimulierten Makrophagen schon nach 30 Minuten zu einer deutlichen Zunahme an phosphoryliertem CREB führte. In pCRE-luc-transfizierten Zellen verstärkte Tautomycin die Aktivität des CREB-abhängigen Promotors. Beide Ergebnisse lassen vermuten, dass der PP1-Inhibitor Tautomycin den Aktivierungsstatus des Transkriptionsfaktor CREB sowohl sehr rasch nach Zugabe des Inhibitors (Western-Analyse: nach 30 min) als auch sehr effizient verstärkt (Reportergen-Assay: Erhöhung der Promotoraktivität um das 3,4-fache). Allerdings scheint Tautomycin einen weniger starken Effekt auszuüben als Rolipram.

### 1.3.7. Einfluss von Tautomycin auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB

In Western-Analysen wurden Gesamtzell-Lysate aus Makrophagen, die mit LPS in An- oder Abwesenheit von Tautomycin inkubiert worden waren, mittels eines spezifischen Antikörpers auf ihren Gehalt an phosphoryliertem CREB untersucht (Abb. 35). Dieses Experiment sollte zeigen, ob der PP1-Inhibitor in direktem Zusammenhang mit der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors steht und womöglich auf diesem Wege die negative Regulation der Produktion von IL-1 $\beta$  moduliert.



**Abb. 35: Western-Analyse zum Einfluss von Tautomycin auf die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB in RAW 264.7-Makrophagen**

4 x 10<sup>6</sup> Makrophagen wurden zwischen 15 und 120 Minuten mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- oder Abwesenheit von Tautomycin [500 nM] inkubiert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte die Auftragung gleicher Proteinmengen. Danach wurden die Proteinextrakte in einer Western-Analyse mit einem spezifischen pCREB-Antikörper, der an Serin133 phosphoryliertes CREB detektiert, untersucht. Die Fragmentgröße von phosphoryliertem CREB beträgt 43 kDa und konnte anhand eines mitgeführten Standards in Vorversuchen identifiziert werden. Durch den Antikörper wird das CREB-verwandte Protein ATF-1 ebenfalls detektiert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

Abkürzungen: M = Medium; L = Lipopolysaccharid; CREB = cAMP-response element binding protein

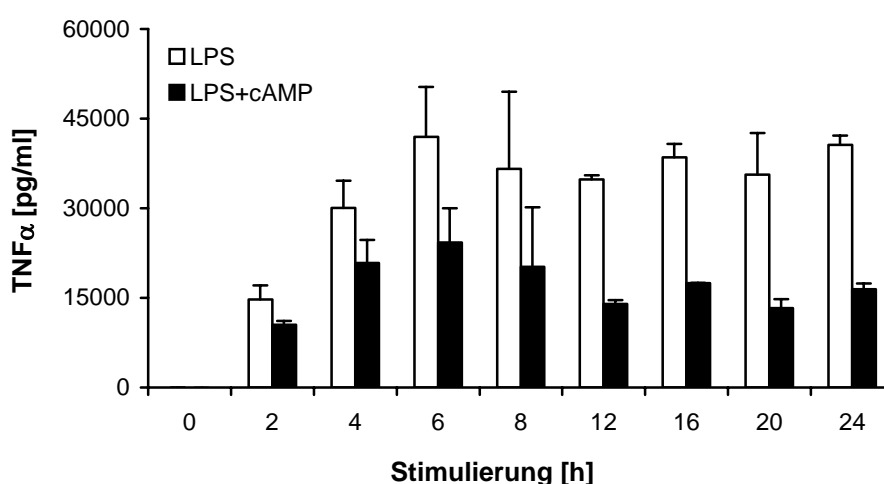
Die Stimulierung von RAW 264.7-Makrophagen mit LPS führte bereits nach 15 Minuten zu einer detektierbaren verstärkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB. Der Phosphorylierungsgrad von CREB nahm bis zu einer Stimulierungsdauer von 60 Minuten kontinuierlich zu, war bei diesem Zeitpunkt am stärksten und nahm gegen 120 Minuten wieder leicht ab. Die Zugabe von Tautomycin verstärkte die Phosphorylierung von CREB in LPS-Anwesenheit zu jedem Zeitpunkt des Experimentes deutlich. Der Grad der Phosphorylierung stieg in Abhängigkeit der Inkubationsdauer gleich bleibend bis zur Inkubationsdauer von 60 Minuten an, nahm gegen 120 Minuten allerdings nicht wieder ab und blieb erhöht. Dieser Versuch gab Hinweise darauf, dass die Inhibition der PP1 durch Tautomycin in Anwesenheit von LPS bereits innerhalb weniger Minuten zu einer verstärkten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führt. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass Tautomycin verlängernd auf den Zeitraum, in dem CREB in phosphorylierter Form vorliegt, einwirkt.

## 2. Untersuchungen zur Regulation von $\text{TNF}\alpha$ in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen

Da  $\text{TNF}\alpha$  neben  $\text{IL-1}\beta$  als prinzipieller Vermittler einer Immunantwort gilt, war es von weiterem Interesse, den Einfluss von Modulatoren des PKA-Wegs auf die Regulation dieses Cytokins zu untersuchen.

### 2.1. Einfluss von cAMP auf die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

Zeitkinetische Studien wurden durchgeführt, um einen möglichen Effekt von cAMP auf die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion zu erforschen. Hierzu wurden Makrophagen für verschiedene Zeitintervalle mit LPS in An- oder Abwesenheit von dB-cAMP inkubiert. Mittels ELISA wurde die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in den Kulturüberständen ermittelt (Abb. 36).



**Abb. 36: Einfluss von dB-cAMP auf die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschieden Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die  $\text{TNF}\alpha$ -Menge in den Kulturüberständen mittels ELISA ermittelt. Das vorliegende Ergebnis stellt den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; cAMP = di-butury-cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat

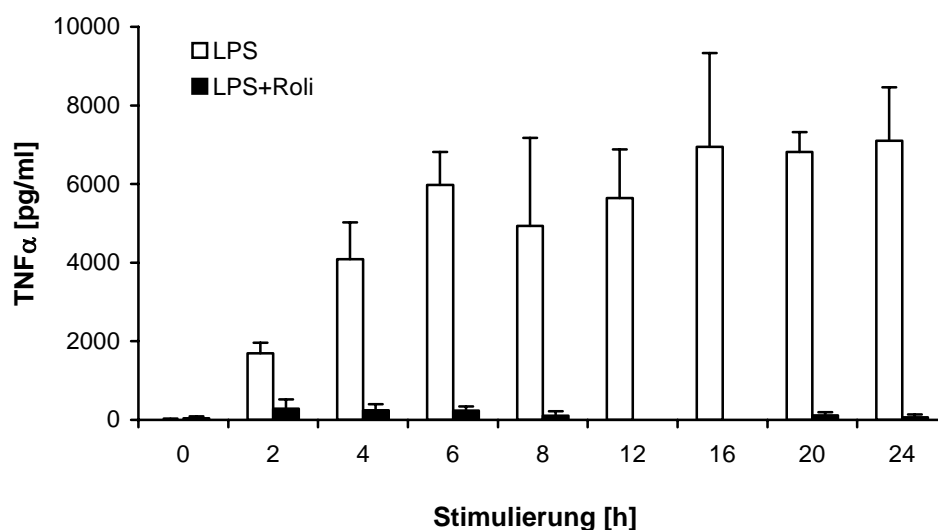
Die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion nach LPS-Aktivierung verläuft sowohl in RAW 264.7-Makrophagen als auch in Knochenmarksmakrophagen [Schilling, 2000] wellenförmig. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Induktion durch LPS besaß nach 6 Stunden ihr absolutes Maximum, fiel im weiteren Verlauf leicht ab, um zwischen 16 und 24 Stunden abermals anzusteigen. In den vorliegenden Versuchen (Abb. 36) war der klassische Verlauf der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ebenfalls zu beobachten. Deutlich war bereits nach zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen der suppressierende Effekt von cAMP auf die Induktion der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion. Über den gesamten zeitlichen Verlauf des

Experiments hinweg verursachte die Anwesenheit von cAMP eine Verminderung der TNF $\alpha$ -Produktion. Zwar lag das Maximum der TNF $\alpha$ -Produktion in Gegenwart von cAMP wie auch bei der LPS-Kontrolle bei 6 Stunden, aber die absolute Höhe der Cytokinproduktion war zu jedem Zeitpunkt relativ zur LPS-Kontrolle um etwa den Faktor 2 reduziert. Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels inhibierte somit die TNF $\alpha$ -Produktion.

## 2.2. Einfluss von Rolipram auf die TNF $\alpha$ -Produktion

Unter Verwendung des Inhibitors Rolipram sollte weiterhin untersucht werden, ob das regulatorische Enzym PDE4 an der Regulation der TNF $\alpha$ -Produktion beteiligt ist und ob seine Inhibition einen cAMP-ähnlichen, inhibierenden Effekt ausübt.

Zunächst wurden Makrophagen mit LPS in An- oder Abwesenheit von Rolipram für verschiedene Zeiten stimuliert, um die Kulturüberstände im ELISA auf ihren Gehalt an TNF $\alpha$  zu untersuchen (Abb. 37).



**Abb. 37: Einfluss von Rolipram auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Die Bestimmung der TNF $\alpha$ -Produktion erfolgte in den Kulturüberständen mittels ELISA. Das Ergebnis stellt den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dar.

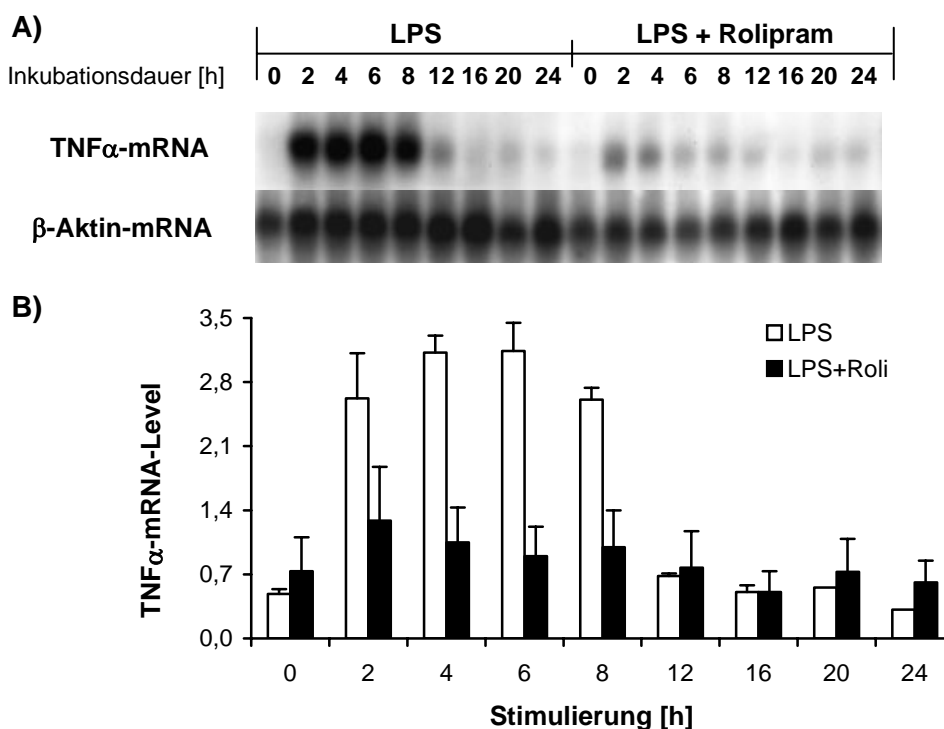
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

In den Überständen LPS-stimulierter Makrophagen konnte bereits nach 2 Stunden eine deutliche TNF $\alpha$ -Produktion festgestellt werden. Die Menge an TNF $\alpha$  nahm mit steigender Inkubationsdauer bis 6 Stunden kontinuierlich zu, fiel zwischen 8 und 12 Stunden leicht ab, um abermals ab 16 Stunden wieder anzusteigen. In Gegenwart von Rolipram wurde die Produktion von LPS-induziertem TNF $\alpha$  zu jedem Untersuchungszeitpunkt sehr stark

unterdrückt. Der inhibitorische Effekt von Rolipram auf  $\text{TNF}\alpha$  liegt deutlich über der Wirksamkeit von dB-cAMP.

### 2.2.1. Einfluss von Rolipram auf die $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Akkumulation

In Northern-Analysen wurde der Einfluss von Rolipram auf die Akkumulation der  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA untersucht. Es sollte gezeigt werden, ob der inhibierende Effekt von Rolipram bereits auf transkriptioneller Ebene deutlich werden würde. Die Gesamt-RNA aus LPS-stimulierten und in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram inkubierten RAW 264.7-Makrophagen wurde elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Vakuum-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Unter Verwendung spezifischer DIG-markierter RNA-Sonden wurde die  $\text{TNF}\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA in Northern-Analysen detektiert (Abb. 38/A). Nach densitometrischer Auswertung wurde das  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Level ermittelt (Abb. 38/B).



**Abb. 38: Einfluss von Rolipram auf die  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

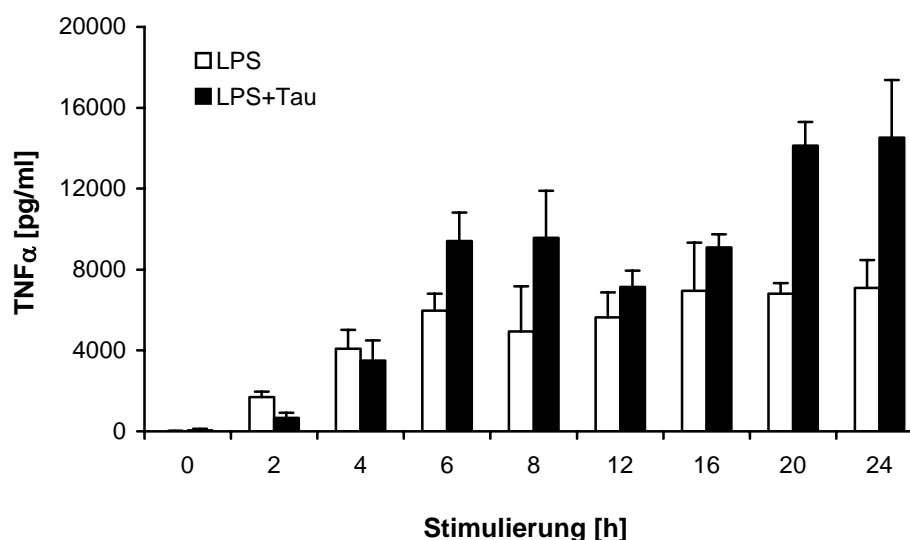
$3,2 \times 10^6$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ] in Gegenwart von Rolipram [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Je  $10 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden in einer Northern-Analyse mit DIG-markierten RNA-Sonden untersucht. A) Hybridisierungsreaktion mit DIG-markierter  $\text{TNF}\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde. B) Densitometrische Auswertung der  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Bande in Bezug zur korrespondierenden  $\beta$ -Aktin-mRNA-Bande. Das Diagramm zeigt das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler aus ein bis drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid, Roli = Rolipram

In LPS-stimulierten Makrophagen stieg die  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Akkumulation bereits nach 2 Stunden deutlich an und erreichte ihr Maximum bei 6 Stunden. Nach 8 Stunden verringerte sich die Akkumulation deutlich und blieb bis 24 Stunden auf diesem verringerten Niveau.

Wurden die Zellen in Gegenwart von LPS und Rolipram inkubiert, so inhibierte Rolipram die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation zwischen 2 und 8 Stunden. Ab einer Inkubationszeit von 12 Stunden war das TNF $\alpha$ -mRNA-Level in LPS- und LPS/Rolipram-behandelten Zellen etwa vergleichbar. Der PDE4-Inhibitor Rolipram hatte folglich im Zeitraum zwischen 2 und 8 Stunden auf der transkriptionellen Ebene den stärksten Einfluss auf die Regulation der TNF $\alpha$ -Produktion. Über 8 Stunden hinaus schien dieser inhibitorische Effekt unwirksam zu werden.

### 2.3. Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -Produktion

RAW 264.7-Makrophagen wurden mit LPS in An- bzw. Abwesenheit des PP1-Inhibitors Tautomycin inkubiert. Im ELISA wurden die Zellkultur-Überstände eingesetzt und auf ihren Gehalt an TNF $\alpha$  hin untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 39 dargestellt.



**Abb. 39: Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

8 x 10<sup>5</sup> Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [1  $\mu$ g/ml] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [500 nM] inkubiert. Mittels ELISA wurde die TNF $\alpha$ -Produktion in den Kulturüberständen ermittelt. Das Ergebnis repräsentiert die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen.

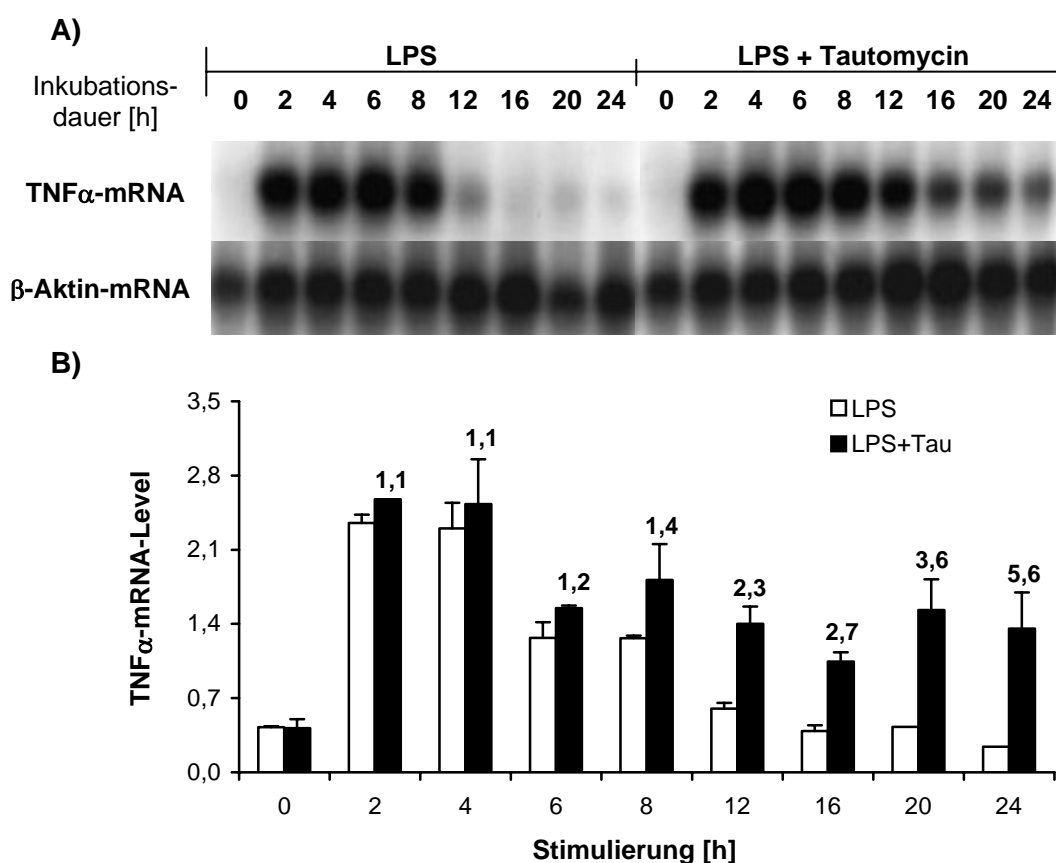
Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

In Gegenwart von Tautomycin wurde die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion leicht verstärkt. Diese Verstärkung wurde vor allem ab 20 Stunden nach LPS-Stimulierung deutlich. Durch dieses Ergebnis konnte gezeigt werden, dass an der Regulation der TNF $\alpha$ -Produktion weitere Mechanismen beteiligt sein müssen, die keine direkte Rolle im PKA-Weg spielen. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz für die differentielle Regulation der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in RAW 264.7-Makrophagen.



### 2.3.1. Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation

In Northern-Analysen sollte mittels Zeitkinetik-Experimenten gezeigt werden, zu welchem Zeitpunkt die Tautomycin-vermittelte Erhöhung der TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation erfolgt. Hierfür wurden Makrophagen mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin inkubiert, die Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Mittels Northern-Analysen wurden unter Verwendung spezifischer Sonden die mRNAs von TNF $\alpha$  bzw.  $\beta$ -Aktin nachgewiesen (Abb. 40/A). Die erhaltenen Schwärzungsmuster auf einem lichtsensitiven Film wurden durch Densitometrie ausgewertet (Abb. 40/B).



**Abb. 40: Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation in RAW 264.7-Makrophagen**

$3,2 \times 10^6$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [ $500 \text{ nM}$ ] inkubiert. Je  $10 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden in einer Northern-Analyse mit DIG-markierten mRNA-Sonden untersucht. A) Hybridisierungsreaktion mit DIG-markierter TNF $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Aktin-mRNA-Sonde. Exemplarisch ist die Northern-Analyse eines Versuchs dargestellt. B) Densitometrische Auswertung der TNF $\alpha$ -mRNA-Bande in Bezug zur korrespondierenden  $\beta$ -Aktin-mRNA-Bande. Die Zahlen innerhalb des Diagramms (B) stellen den Tautomycin-Faktor dar, der angibt, um das wievielfache Tautomycin das LPS-induzierte TNF $\alpha$ -mRNA-Level in Makrophagen erhöht. Ermittelt wird der Faktor durch die Division des TNF $\alpha$ -mRNA-Levels (LPS + Tautomycin) durch das TNF $\alpha$ -mRNA-Level (LPS) ohne Tautomycin. Das Diagramm zeigt das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler aus ein bis drei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid, Tau = Tautomycin

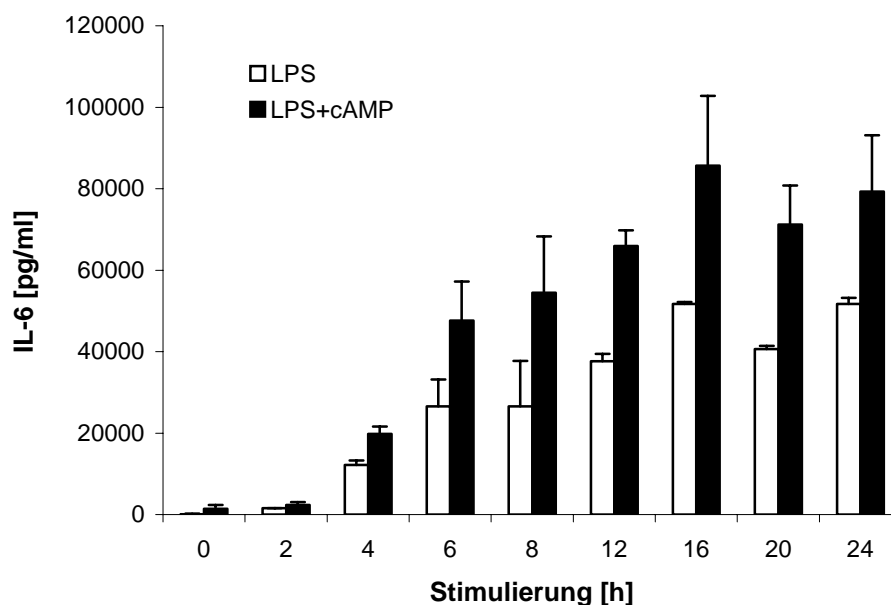
Hinsichtlich der mRNA-Akkumulation hatte Tautomycin einen vergleichbaren Effekt auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten Makrophagen, wenn dieser Einfluss auf Proteinebene auch zeitlich etwas verzögert beobachtet wurde. Eine deutliche Akkumulation der TNF $\alpha$ -mRNA erfolgte bereits nach 2 Stunden LPS-Stimulierung und blieb bis 4 Stunden auf diesem hohen Level, das den Maximalwert der mRNA-Akkumulation bei diesem Versuch darstellt. Ab 6 Stunden verringerte sich die mRNA-Menge gleichmäßig bis zu einem Minimalwert bei 24 Stunden. In Anwesenheit von Tautomycin aber erfolgte eine verstärkte Akkumulation der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -mRNA-Menge vor allem ab 12 Stunden. Mit steigender Inkubationszeit nahm der Tautomycin-Faktor zu. Die Verstärkung der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Produktion erfolgt somit bereits auf Ebene der mRNA-Akkumulation.

### **3. Untersuchungen zur Regulation von IL-6 in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen**

Das proinflammatorische Cytokin IL-6 ist innerhalb inflammatorischer Prozesse speziell an der B-Zell-Aktivierung beteiligt. Ergebnisse früherer Arbeiten [Schilling, 2000] unter Verwendung des Serin/Threoninkinase-Inhibitors Staurosporin hatten bereits gezeigt, dass die Produktion von IL-6 negativ reguliert ist. Staurosporin vermittelte eine Erhöhung der IL-6-Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen, nicht jedoch, wenn der Inhibitor gleichzeitig mit LPS verabreicht wurde. Somit gab es Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation von IL-1 $\beta$  und IL-6. Mit den bereits zur Untersuchung der Regulation von IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$  eingesetzten Modulatoren sollte die Regulation der IL-6-Produktion eingehender untersucht werden.

#### **3.1. Einfluss von dB-cAMP auf die IL-6-Produktion**

Zur Überprüfung des Einflusses von cAMP auf die IL-6-Produktion in RAW 264.7-Makrophagen wurden diese in Zeitkinetikexperimenten mit LPS in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP stimuliert. In den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA die IL-6-Produktion bestimmt. In Abb. 41 ist das Ergebnis dargestellt.



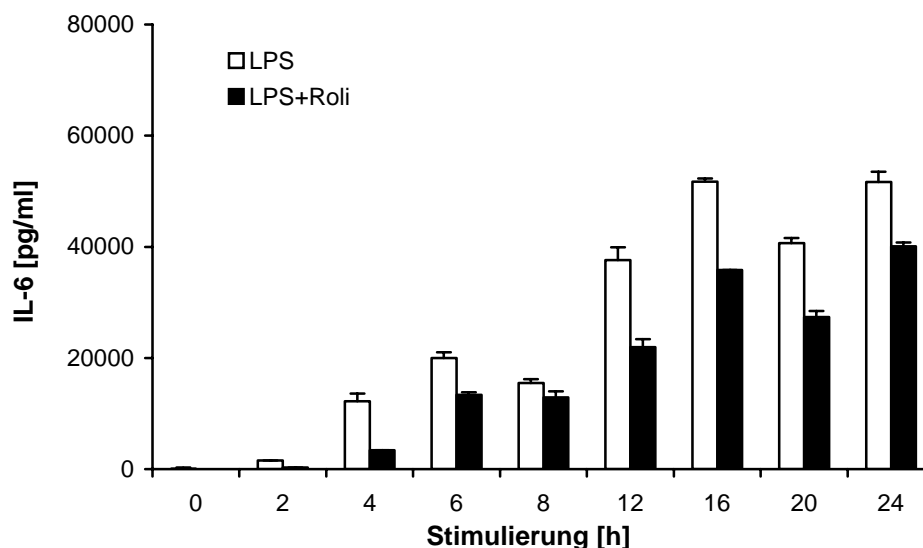
**Abb. 41: Einfluss von dB-cAMP auf die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von dB-cAMP [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Mittels ELISA wurde die IL-6-Produktion in den Kulturüberständen ermittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; cAMP = di-butury-cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat

Ab einer Inkubationsdauer von 2 Stunden stieg die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen kontinuierlich an und erreichte nach 16 Stunden ihr Maximum. Die Zugabe von dB-cAMP führte bereits nach 2 Stunden zu einer leichten Verstärkung der IL-6-Produktion. Über den gesamten Zeitkinetik-Verlauf hinweg war die LPS-induzierte IL-6-Produktion in Gegenwart von cAMP etwa um den Faktor 1,8 höher als in LPS-stimulierten Makrophagen. Die Regulation der IL-6-Produktion scheint somit zum Teil zumindest PKA-abhängig zu sein und kann durch die Zugabe exogenen cAMPs moduliert werden.

### 3.2. Einfluss von Rolipram auf die IL-6-Produktion

Der Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte IL-6-Produktion wurde unter Verwendung von Zellkulturüberständen nach verschiedener LPS-Stimulierungsdauer von Makrophagen in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram im ELISA untersucht (Abb. 42).



**Abb. 42: Einfluss von Rolipram auf die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

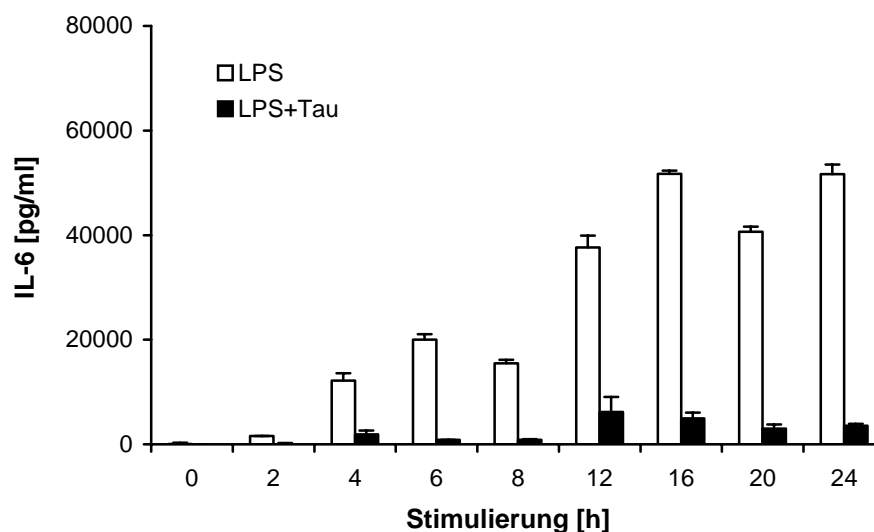
$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Mittels ELISA wurde die IL-6-Produktion in den Kulturüberständen ermittelt. Die Abbildung stellt die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

Rolipram führte in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen im Gegensatz zu cAMP zu einer leichten Inhibition der IL-6-Produktion. Die Cytokin-Produktion wurde in Anwesenheit von Rolipram nicht vollständig inhibiert, lag aber nach 8 Stunden Inkubationsdauer unter den mit LPS in Abwesenheit von Rolipram erhaltenen Werten. Durch dieses Ergebnis kann vermutet werden, dass die LPS-induzierte IL-6-Produktion in RAW 264.7-Makrophagen zwar durch die Zugabe exogenen cAMPs verstärkt werden kann, dass an dieser Regulation das Enzym PDE4 aber bestenfalls eine untergeordnete Rolle spielt.

### 3.3. Einfluss von Tautomycin auf die IL-6-Produktion

Nachdem die Zugabe exogenen cAMPs die Produktion von IL-6 zwar erhöhte, der PDE4-Inhibitor Rolipram die entsprechende Cytokinmenge jedoch eher reduziert hatte, wurden die Überstände von LPS-behandelten Makrophagen auf ihren Gehalt an IL-6 im ELISA überprüft, die in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin für verschiedene Zeiten inkubiert worden waren. Es sollte festgestellt werden, wie der PP1-Inhibitor, der die Produktion von IL- $1\beta$  und TNF $\alpha$  in LPS-stimulierten Zellen sowohl auf translationaler als auch transkriptioneller Ebene verstärkt hatte, auf die Produktion des Cytokins IL-6 einwirken würde (Abb. 43).



**Abb. 43: Einfluss von Tautomycin auf die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [ $500 \text{ nM}$ ] inkubiert. Mittels ELISA wurde die IL-6-Produktion in den Kulturüberständen ermittelt. Die Abbildung stellt die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Tautomycin verringerte die LPS-induzierte IL-6-Produktion bereits nach kurzer LPS-Inkubationszeit sehr stark. Zwar stieg die IL-6-Menge nach einer 4-stündigen Inkubationszeit mit LPS und Tautomycin leicht an, doch lagen die Werte zeitunabhängig deutlich unter der LPS-induzierten IL-6-Produktion. An der positiven Regulation von IL-6 scheint die PP1 eine bedeutende Rolle zu spielen, da die Inhibition dieses Enzyms durch Tautomycin eine dramatische Reduktion der Cytokin-Produktion nach sich zieht.

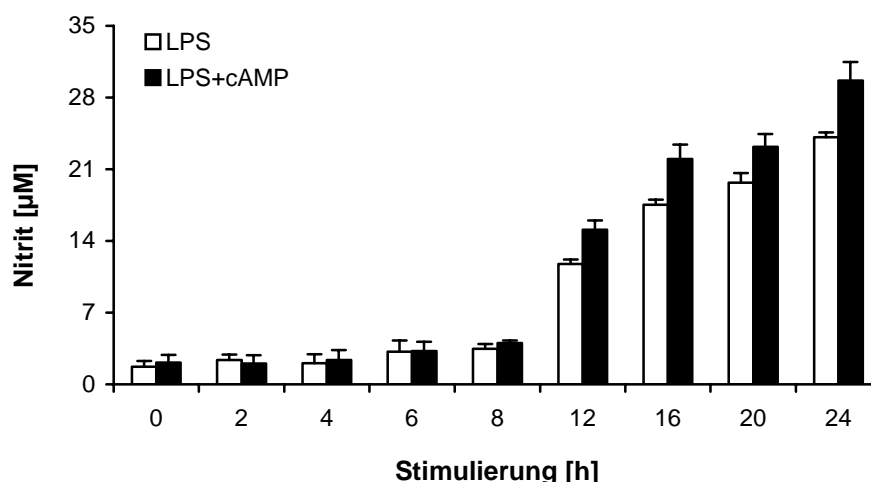
#### 4. Die Produktion von Stickstoffmonoxid

Nachdem Pang & Hout [1997] von der Repression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) durch cAMP-erhöhende Substanzen berichtet hatten, und von Schilling et al. [2001] ein Staurosporin-vermittelter Rückgang der Stickstoffmonoxid-Produktion in RAW 264.7- und Knochenmarksmakrophagen beschrieben worden war, war es von Interesse, den Einfluss von exogenem cAMP, Rolipram bzw. Tautomycin auf die iNOS in RAW 264.7-Makrophagen zu untersuchen.

##### 4.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von Stickstoffmonoxid

dB-cAMP wurde LPS-stimulierten Makrophagen für verschiedene Inkubationszeiten zugegeben. In Gegenwart von Sauerstoff wird NO zu Nitrit umgewandelt. Daher wird NO indirekt als Nitrit in den Kulturüberständen gemessen. Hierzu wurden die Kulturüberstände

mit Griess-Ilosvays-Reagenz versetzt und unter Mitführung eines Natriumnitrit-Standards kolorimetrisch auf ihren Gehalt an Nitrit hin untersucht (Abb. 44).



**Abb. 44: Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

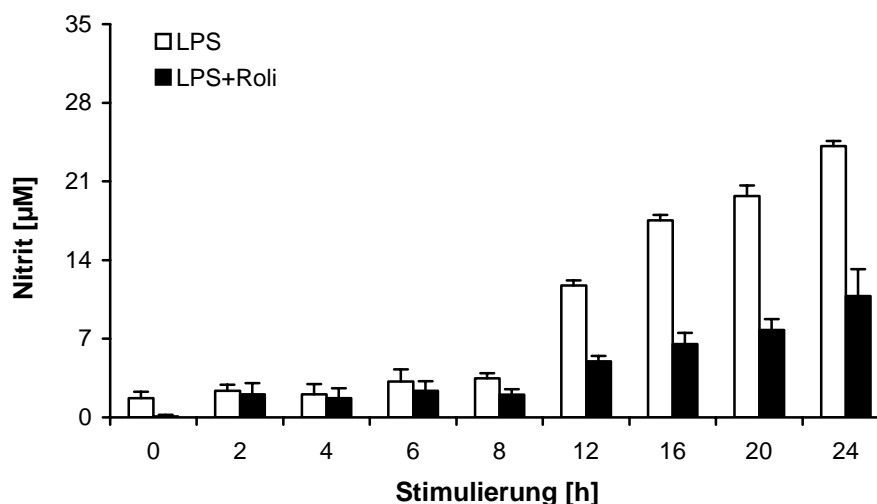
$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- oder Abwesenheit von dB-cAMP [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Zur Kontrolle wurden eine Mediums- und eine LPS-Kontrolle ohne dB-cAMP mitgeführt. Die Ermittlung der Nitrit-Menge in den Kulturüberständen erfolgte mittels Griess-Ilosvays-Reagenz und gilt als indirekter Nachweis der Stickstoffmonoxid-Produktion. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler repräsentieren das Resultat aus zwei unabhängigen Versuchen.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; cAMP = di-buturyl-cyclisches-3'-5'-Adenosinmonophosphat

Die deutliche Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen setzte erst relativ spät, d.h. ab einer Inkubationsdauer von 12 Stunden, ein. Die produzierte Menge an NO nahm von diesem Zeitpunkt an bis zu ihrem Maximum bei 24 Stunden gleichmäßig zu. Die Anwesenheit von dB-cAMP führte zu allen untersuchten Zeitpunkten ab 12 Stunden nur zu einer geringfügigen Erhöhung der NO-Produktion, die nicht signifikant war. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel schien daher für die Aktivität der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) keine Rolle zu spielen.

#### 4.2. Einfluss von Rolipram auf die Stickstoffmonoxid-Produktion

Für die Untersuchung der NO-Produktion in RAW 264.7-Makrophagen zum Einfluss des cAMP-erhöhenden PDE4-Inhibitors Rolipram wurden Zellen mit LPS in dessen An- bzw. Abwesenheit für verschiedene Zeiten inkubiert und die Kulturüberstände kolorimetrisch durch eine Farbreaktion nach Zugabe von Griess-Ilosvays-Reagenz auf ihren Gehalt an Nitrit untersucht (Abb. 45).



**Abb. 45: Einfluss von Rolipram auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

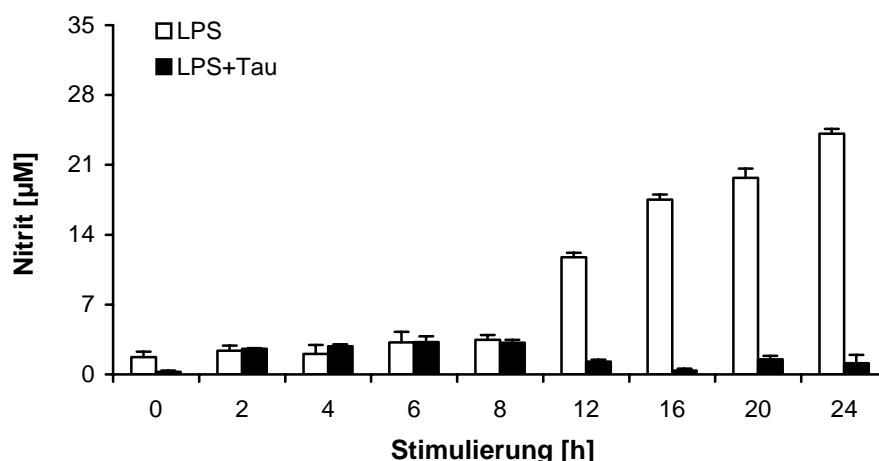
$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Rolipram [ $100 \mu\text{M}$ ] inkubiert. Die Ermittlung der Nitrit-Produktion in den Kulturüberständen erfolgte mittels Griess-Ilosvays-Reagenz und gilt als indirekter Nachweis der Stickstoffmonoxid-Bildung. Das Ergebnis stellt den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Roli = Rolipram

Zwischen 0 und 8 Stunden Inkubationsdauer lag die LPS-induzierte NO-Menge in Makrophagen auf einem geringen Niveau. Ab einer Stimulierungsdauer von 12 Stunden nahm die NO-Produktion deutlich und kontinuierlich zu und erreichte nach 24 Stunden ihr Maximum. Rolipram reduzierte die LPS-induzierte NO-Produktion in RAW 264.7-Makrophagen zwischen 12 und 24 Stunden etwa um den Faktor 2. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde vermutet, dass die Regulation der NO-Produktion wohl nicht vollständig, aber doch zu einem Teil von der Aktivität der PDE4 abhängig sein könnte. Die Zugabe exogenen cAMPs hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die NO-Produktion. Es kann angenommen werden, dass Rolipram neben der Erhöhung des cAMP-Spiegels weitere Signalmediatoren in ihrer Wirkung beeinflusst, so z.B. das an  $\text{TNF}\alpha$ - oder NO-Produktion beteiligte NF- $\kappa\text{B}$ .

#### 4.3. Einfluss von Tautomycin auf die Produktion von Stickstoffmonoxid

Von Tautomycin war aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bereits bekannt, dass es die LPS-induzierte IL- $1\beta$ - und  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion im Gegensatz zur IL-6-Produktion in RAW 264.7-Makrophagen deutlich erhöht. Um mehr über die Signaltransduktionsvorgänge zu erfahren, die an der NO-Produktion beteiligt sind, wurden LPS-stimulierte Makrophagen für verschiedene Zeiten mit dem PP1-Inhibitor Tautomycin inkubiert und die Kulturüberstände nach der Zugabe von Griess-Ilosvays-Reagenz kolorimetrisch auf ihren Gehalt an Nitrit untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 46 dargestellt.



**Abb. 46: Einfluss von Tautomycin auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

$8 \times 10^5$  Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit LPS [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] in An- bzw. Abwesenheit von Tautomycin [ $500 \text{ nM}$ ] inkubiert. Die Ermittlung der Nitrit-Produktion in den Kulturüberständen erfolgte mittels Griess-Ilosvays-Reagenz und gilt als indirekter Nachweis der Stickstoffmonoxid-Bildung. Das Ergebnis stellt den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus zwei unabhängigen Versuchen dar.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; Tau = Tautomycin

Bis zu einer Inkubationsdauer von 8 Stunden produzierten LPS-stimulierte RAW 264.7-Makrophagen nur sehr wenig NO. Ab 12 Stunden LPS-Stimulierungsdauer nahm die produzierte NO-Menge plötzlich dramatisch zu und stieg mit zunehmender Inkubationsdauer kontinuierlich an. In Anwesenheit des PP1-Inhibitors Tautomycin wurde die NO-Produktion zwischen 0 und 8 Stunden nicht beeinflusst. Ab einer Inkubationszeit von 12 Stunden jedoch inhibierte Tautomycin die NO-Produktion vollständig. Durch dieses Ergebnis wurde deutlich, dass die LPS-induzierte Produktion von NO erst nach 12 Stunden beginnt und von der Aktivität der PP1 in hohem Maße abhängig zu sein scheint. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die PP1 wesentlich an der Regulation der NO-Produktion beteiligt ist, da die Inhibition der PP1 zu einer vollständigen Inhibition der LPS-induzierten NO-Menge führt.



## **V. Diskussion**

### **1. Die differenzierte Regulation der Produktion der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IL-6**

Proinflammatorische Cytokine spielen als Botenstoffe des Immunsystems eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen und tragen hierdurch wesentlich zur wirkungsvollen Immunabwehr bei. Negative Aspekte der entzündungsvermittelnden Cytokine werden deutlich, wenn sie dauerhaft oder in großen Mengen produziert werden. Beispielsweise sind sie in diesem Zusammenhang an der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Die den Cytokinproduktionen zugrundeliegenden Mechanismen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt, sie sind aber von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung von Therapieansätzen zur Behandlung Cytokin-vermittelter Erkrankungen. Durch eine differenzierte Kontrolle der verschiedenen Entzündungsmediatoren wäre es möglich, die vielfältigen durch IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 hervorgerufenen Effekte präziser regulieren zu können. Die Entschlüsselung der intrazellulären Signalwege zur Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 wird jedoch dadurch erschwert, dass eine Stimulierung von Makrophagen mit LPS zur fast gleichzeitigen Produktion dieser Cytokine führt, wobei ihr zeitlicher Produktionsverlauf in Untersuchungen von Manthey et al. [1992] und Knopf et al. [1994] als ähnlich beschrieben wurde. Die Promotorbereiche der erwähnten Proteine enthalten zudem die gleichen Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren CREB, NF- $\kappa$ B, NF-IL6, AP-1 und PU.1 (s. Einleitung), die bei der Induktion der Gentranskription von Bedeutung sind.

Um weitergehende Aussagen über die differenzierte Regulation von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 treffen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren mögliche Kontrollpunkte in den Signaltransduktionswegen, die zur Bildung der Cytokine führen, erforscht. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass eine wichtige negative Kontrolle über die Produktion von IL-1 $\beta$  auf der Ebene der Transkription erfolgt [Schilling et al., 2001].

Der Transkriptionsfaktor CREB wurde durch Akira & Kishimoto [1997] als wichtiger Faktor für die Expression des IL-1 $\beta$ - und IL-6-Gens beschrieben. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B hingegen gilt für die Genexpression von IL-1 $\beta$  zwar nicht als essentieller Faktor, wird aber für maximale Transkriptionsraten als erforderlich bezeichnet [Auron & Webb, 1994]. Für die Gen-Transkription der ebenfalls für diese Arbeit interessanten Cytokine TNF $\alpha$  und IL-6 scheint NF- $\kappa$ B jedoch essentiell zu sein [Shakhov et al., 1990; Akira & Kishimoto, 1997]. In erster Linie sollten Mechanismen, die diese Transkriptionsfaktoren bei der differenzierten Regulation der Produktion proinflammatorischer Cytokine einschließen, untersucht werden.

## **2. Kinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen**

Zahlreiche Mechanismen wurden bislang postuliert, um die Regulation der LPS-vermittelten IL-1 $\beta$ -Induktion erklären zu können. Hierzu zählen die Inhibition der Transkription [Knudsen et al., 1987], eine verringerte Stabilität der IL-1 $\beta$ -mRNA [Lee et al., 1988] und die Inhibition der Proteinsekretion [Kern et al., 1988].

Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten bereits auf eine unterschiedliche Regulation der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  hingewiesen [Weber et al., 1993; Brauburger, 1996; Schilling, 1996]. IL-6 scheint zudem unabhängig von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  reguliert zu werden [Schilling, 2000; Schilling et al., 2002]. Durch Untersuchungen von Schilling et al. [2001] war bekannt, dass die negative Regulation der LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion in Gegenwart des allgemeinen Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin bei gleichzeitiger Inhibition von TNF $\alpha$  und NO aufgehoben wurde. Die genauen Vorgänge der Regulation von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und NO sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Da die Zugabe von dB-cAMP in LPS-aktivierten Peritoneal-Makrophagen einen dem Staurosporin ähnlichen Effekt auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation hatte [Ohmori et al., 1990], wurde vermutet, dass Komponenten des cAMP-abhängigen PKA-Wegs an der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  beteiligt sein könnten.

LPS allein induziert eine vom Zelltyp abhängige, in der Regel schnelle und transiente Verstärkung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation [Kovacs et al., 1988]. Die Autoren beschreiben eine kontinuierliche Abnahme der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation ab einer Inkubationsdauer von 12 Stunden, was mit den in RAW 264.7-Makrophagen erhaltenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (Abb. 20). Da die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels sowohl in Peritoneal-Makrophagen als auch in murinen Microglia-Zellen zu einer verstärkten IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation geführt hatte [Ohmori et al., 1990; Petrova et al., 1999], sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Beteiligung des cAMP-sensitiven PKA-Wegs an der negativen Regulation der Cytokinproduktion von IL-1 $\beta$  in murinen RAW 264.7-Makrophagen untersucht werden. Nicht veröffentlichte Voruntersuchungen hatten einen Hinweis darauf geliefert, dass LPS in Abhängigkeit der Inkubationsdauer den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht.

Bei der Stimulierung von RAW 264.7-Makrophagen mit LPS konnte in der vorliegenden Arbeit die schnelle, aber transiente Produktion von IL-1 $\beta$  gezeigt werden (Abb. 19); diese erreichte einen Höhepunkt nach einer LPS-Stimulierungsdauer von 8 Stunden. Zwischen 8 und 12 Stunden scheint der negative Regulationsmechanismus einzugreifen, der die Produktion von IL-1 $\beta$  bis zu einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zunehmend reduziert.

### **2.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$**

Durch die Zugabe von dB-cAMP wurde in den kinetischen Studien der vorliegenden Arbeit zu jedem Zeitpunkt ab 2 Stunden eine gegenüber der LPS-Kontrolle verstärkte Produktion von IL-1 $\beta$  festgestellt. cAMP vermittelte über den gesamten Verlauf der Untersuchung eine Verstärkung der IL-1 $\beta$ -Menge um den Faktor 2. Durch eine Northern-Analyse wurde die tendenziell verstärkende Wirkung von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation aufgezeigt (Abb. 20), wenn auch Wiederholungsexperimente für eine zuverlässige Aussage notwendig sein werden. Wie bei der Cytokinproduktion vermittelte dB-cAMP über den Versuchsverlauf hinweg eine durchschnittliche Erhöhung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation um den Faktor 2. dB-cAMP scheint wie auch Staurosporin die negative Regulation von IL-1 $\beta$  auf der Ebene der mRNA-Akkumulation aufzuheben und zu einer Erhöhung der Transkript- als auch der Proteinmenge zu führen.

Die Effekte von intrazellulärem cAMP scheinen in Abhängigkeit des Zelltyps stark zu variieren. Verghese et al. [1995] zufolge kann eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in humanen Monocyten die Regulation von IL-1 $\beta$  sowohl negativ als auch positiv beeinflussen. Knudsen et al. [1986] beschrieben in Blutmonocyten sogar einen durch cAMP-vermittelten inhibierenden Effekt auf die IL-1 $\beta$ -Produktion. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde IL-1 $\beta$  in diesem Fall anhand von Aktivitätsmessungen nachgewiesen.

### **2.2. Einfluss von Rolipram auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$**

Es wurde vermutet, dass eine mögliche Regulation der Produktion von cAMP im PKA-Weg durch die PDE4 geleistet werden könnte, die in Makrophagen vorhanden ist. Andere Arbeitsgruppen hatten berichtet, dass der PDE4-Inhibitor Rolipram eine Erhöhung des cytoplasmatischen cAMP-Levels in LPS-stimulierten Makrophagen bewirkte [Greten et al., 1995; Cheng et al., 1997; Goncalves de Moraes et al., 1998]. In der vorliegenden Arbeit wurde die IL-1 $\beta$ -Menge in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen konzentrationsabhängig durch die Zugabe von Rolipram erhöht (Abb. 21). Der Inhibitor erhöhte in diesen Zellen ebenfalls die Menge an intrazellulärem cAMP (nicht gezeigt). Rolipram hob die negative Regulation von IL-1 $\beta$  erst nach einer Inkubationsdauer von 12 Stunden auf. Der erhöhende Effekt auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen durch Rolipram konnte ebenfalls auf der Ebene der mRNA-Akkumulation festgestellt werden. Zwar vermittelte Rolipram bereits ab einer Inkubationszeit von 6 Stunden eine mehr als 2-fache Erhöhung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation, doch stieg der Rolipram-Effekt nach einer Stimulierung von 12 Stunden sprunghaft auf das 8-fache im Vergleich zur LPS-Kontrolle an. Bis 24 Stunden blieb die mRNA-Akkumulation in Gegenwart von Rolipram deutlich verstärkt. Dieses Ergebnis stimmt mit der Produktion des IL-1 $\beta$ -Proteins nach Zugabe von LPS und Rolipram im zeitlichen Verlauf überein. Rolipram scheint daher über die Erhöhung von cAMP den PKA-Signalweg zu beeinflussen und die negative Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion aufzuheben. Es war auffallend, dass die IL-1 $\beta$ -Produktion

und -mRNA-Akkumulation nach Zugabe von dB-cAMP im Vergleich zu Rolipram schneller erfolgte. Bereits nach 2 Stunden wurde die Proteinmenge durch dB-cAMP deutlich verstärkt gegenüber einer Inkubationsdauer von 12 Stunden mit Rolipram. Es wurde vermutet, dass sowohl dB-cAMP als auch Rolipram diesen Effekt über eine verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB vermitteln. Der Einsatz von dB-cAMP jedoch führt zu einer schnelleren Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Produktion.

Eine Erklärung für die unterschiedliche Dauer bis zum Einsetzen des cAMP-Effekts beruht auf der unterschiedlichen Verfügbarkeit von cAMP. Durch die direkte Zugabe von dB-cAMP wird der intrazelluläre cAMP-Spiegel bereits ab 2 Stunden erhöht. Die Rolipram-vermittelte Verstärkung von cAMP erfolgt hingegen verzögert, da die Effekte der PDE4 nach 12 Stunden einsetzen, und die Wirkung der Inhibition erst nach dieser Zeit beobachtet werden kann. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die PDE4 einen wichtigen Kontrollpunkt in der natürlichen Regulation des IL-1 $\beta$ -Gens nach LPS-Induktion darstellt.

### 2.3. Einfluss von Tautomycin auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$

Schilling [2000] hatte durch den Einsatz verschiedener Proteinphosphatase-Inhibitoren bereits in RAW 264.7- und Knochenmarksmakrophagen zeigen können, dass der spezifische PP1-Inhibitor Tautomycin die IL-1 $\beta$ -Produktion konzentrationsabhängig erhöht.

Es wurde daher vermutet, dass die PP1 ebenfalls eine Rolle bei der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  spielen könnte. Um den genauen Zeitpunkt des Eingreifens von Tautomycin in die Regulation von IL-1 $\beta$  bestimmen zu können, wurden Makrophagen für verschiedene Zeiten mit LPS in An- oder Abwesenheit des PP1-Inhibitors inkubiert (Abb. 30). Tautomycin verstärkte bereits ab einer Stimulierungsdauer von 6 Stunden die IL-1 $\beta$ -Produktion anhaltend bis zur höchsten Inkubationsdauer von 24 Stunden. Der deutliche Effekt war jedoch wie bei Rolipram erst 12 Stunden nach LPS-Stimulierung zu beobachten. Wie im Falle von Rolipram nahm der durch Tautomycin-vermittelte Effekt auf die LPS-induzierte Cytokinproduktion mit steigender Inkubationsdauer kontinuierlich zu. Auf transkriptioneller Ebene zeigte Tautomycin in LPS-behandelten Makrophagen wie auch auf der Ebene der Proteinproduktion eine Verstärkung der IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation (Abb. 30 und 31).

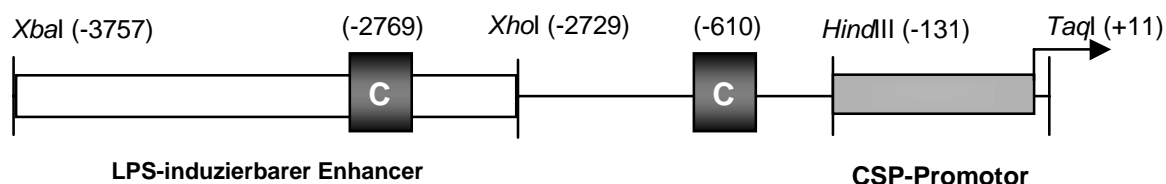
Yoza et al. [1998] haben in humanen THP-1-Zellen (eine humane Monozyten-Zelllinie) eine durch *ocadaic acid* verursachte Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Produktion beschrieben, die die Autoren einer Stabilisierung der IL-1 $\beta$ -mRNA zuordnen. Demnach würden Proteinphosphatasen den Abbau des Cytokintranskripts vermitteln. In wieweit der in RAW 264.7-Makrophagen durch Tautomycin verursachte Effekt der verstärkten IL-1 $\beta$ -Produktion ebenfalls auf einer Stabilisierung der mRNA beruht, wird in weiteren Untersuchungen zu klären sein. Die negative Regulation von IL-1 $\beta$ , die durch Staurosporin aufgehoben wird, beruht allerdings nicht auf einer Abnahme der mRNA-Stabilität. Diese Regulation findet primär auf der Ebene der Transkription statt [Schilling et al., 2001].

### 3. Promotoraktivitätsstudien zum Einfluss von Rolipram und Tautomycin auf das humane IL-1 $\beta$ -Gen

Da die Inhibitoren Rolipram und Tautomycin unabhängig voneinander die Produktion von IL-1 $\beta$  in kinetischen Studien moduliert hatten, war es ferner von Interesse festzustellen, ob dieser Einfluss bereits auf der Promotoraktivität des IL-1 $\beta$ -Gens ausgeübt würde. Um darüber hinaus den Bereich des Gens einzugrenzen, der maßgeblich an der Regulation von IL-1 $\beta$  beteiligt ist, wurde in den Transfektionsstudien neben einem Reportergenkonstrukt mit der vollständigen *Enhancer*- und Promotorsequenz des IL-1 $\beta$ -Gens (pXT-luc) ein Konstrukt mit einem verkürzten Promotorbereich (pX2-HT-luc) eingesetzt (s. Einleitung).

Die Zugabe von Rolipram (Abb. 25) führte in mit pXT-luc transfizierten Zellen zu einer 9,6-fachen Verstärkung der LPS-induzierten Promotoraktivität gegenüber einer 4,8-fachen Erhöhung durch Tautomycin (Abb. 32). Die Inhibition der PDE4 führte somit zu einer stärkeren Erhöhung der Promotoraktivität als eine Blockierung der PP1-Aktivität.

Durch die Verwendung von pX2-HT-luc zeigte sich, dass neben der *Enhancer*- und der minimalen IL-1 $\beta$ -Promotorregion ein weiterer Abschnitt des vollständigen Promotors für die Erhöhung der LPS-induzierten Promotoraktivität durch Rolipram und Tautomycin erforderlich zu sein scheint. Die IL-1 $\beta$ -Promotoraktivität in mit pX2-HT-luc transfizierten Zellen war nach einer 24-stündigen Stimulierung mit LPS in Gegenwart von Rolipram bzw. Tautomycin deutlich verringert und betrug durch Rolipram das 1,8-fache, bzw. das 1,2-fache der LPS-Induktion im Falle von Tautomycin (Abb. 27 und 33). Die Verstärkung der LPS-induzierten Aktivität des minimalen IL-1 $\beta$ -Promotors durch den Einsatz von Rolipram war somit nicht wesentlich höher als durch Tautomycin. Es kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse angenommen werden, dass die Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion wesentlich auf der Ebene der Promotoraktivität reguliert zu werden scheint und der in pX2-HT-luc entfernte Abschnitt des IL-1 $\beta$ -Promotors vermutlich von zentraler Bedeutung bei der Regulation dieser Cytokin-Produktion ist.



**Abb. 47: Der *Enhancer*- und Promotorbereich des humanen IL-1 $\beta$ -Gens**

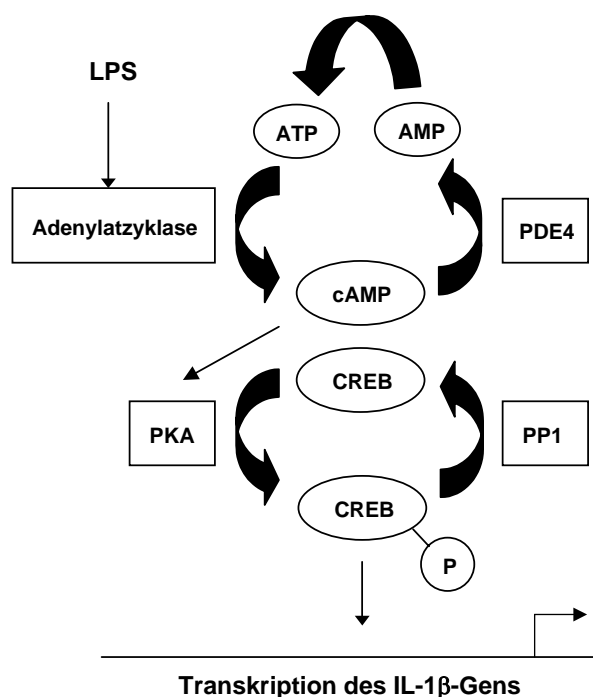
Die schwarzen Kästchen symbolisieren die putativen Bindestellen des Transkriptionsfaktors CREB im *Enhancer*- und Promotorbereich des humanen IL-1 $\beta$ -Gens (GenBank *accession number* U26540 und X04500). Zusätzlich sind die bisher identifizierten *cis-acting* Elemente im humanen IL-1 $\beta$ -Gen stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Pfeil) dargestellt (LPS-induzierbarer *Enhancer* in weiß, CSP-Promotor in grau), die eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten IL-1 $\beta$ -Produktion spielen. In Klammern sind die Positionen der Basenpaare stromaufwärts (-) bzw. stromabwärts (+) vom Transkriptionsstart angegeben.

Abkürzungen: c = cAMP-response element binding site (CRE); CSP-Promotor = cap-site proximal Promotor

Der *Enhancer*- und Promotor-Bereich des humanen IL-1 $\beta$ -Gens enthält zwei putative CRE-Bindesequenzen (Abb. 47). Neben einer möglichen CRE-Sequenz im vollständigen Promotorbereich an Position -607 (Basenpaar *upstream* des Transkriptionsstarts) besitzt das Gen eine weitere CRE-Bindestelle in der LPS-induzierbaren *Enhancer*-Region. Gray et al. [1993] beschrieben eine CRE/ATF-ähnliche Bindestelle in der regulatorischen Sequenz des humanen IL-1 $\beta$ -Gens als erforderlich für die Promotor-Induktion in U937-Zellen (humane histiozytische Lymphomzellen) und THP-1-Zellen, die nur wenige Nukleotide *upstream* einer NF- $\kappa$ B-Bindestelle lokalisiert ist. In zusätzlichen Reporter-gen-Assays wird durch weitere Reporter-genkonstrukte der Bereich näher eingegrenzt werden müssen, der für die verstärkenden Effekte von Rolipram und Tautomycin verantwortlich ist.

Durch den Einsatz des Reporter-genkonstruktes pCRE-luc (s. Material & Methoden) in Transfektionsstudien sollte auf indirektem Wege untersucht werden, ob die Inhibitoren Rolipram bzw. Tautomycin einen Einfluss auf die LPS-vermittelte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB haben und ihn hierdurch verstärkt aktivieren. pCRE-luc trägt einen CREB-induzierbaren Promotor, dessen Induktion von phosphoryliertem CREB abhängig ist. In den Versuchen zeigte sich, dass pCRE-luc schwach LPS-induzierbar ist, dass aber sowohl Rolipram (Abb. 28) als auch Tautomycin (Abb. 34) eine deutliche Promotoraktivitätssteigerung in Gegenwart von LPS vermitteln können. Rolipram verstärkte die LPS-Induktion des Promotors um den Faktor 14,9, Tautomycin hingegen nur um den Faktor 3,4. Rolipram scheint daher in deutlich stärkerem Maße die LPS-induzierte Promotoraktivität in pCRE-luc-transfizierten RAW 264.7-Makrophagen zu beeinflussen als Tautomycin.

Weniger überzeugend als im Reporter-gen-Assay konnte der unmittelbare Einfluss von Rolipram und Tautomycin auf die Phosphorylierung des für die IL-1 $\beta$ -Transkription wichtigen Transkriptionsfaktors CREB in Western-Analysen gezeigt werden. Die Inkubation mit LPS führte bereits nach 30 Minuten zu einer gesteigerten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors, die nach 60 Minuten am höchsten war und nach 2 Stunden wieder abnahm (Abb. 29). In Gegenwart von Rolipram und Tautomycin war die CREB-Phosphorylierung ab 15 Minuten Stimulierungsdauer verstärkt und blieb bis 2 Stunden auf einem höheren Level als nach alleiniger Inkubation mit LPS. Dieses Ergebnis war in ähnlicher Weise von Wu et al. [2001] in Neuronen des Hippocampus beschrieben worden. Die Erhöhung der Phosphorylierung von CREB durch Rolipram und Tautomycin war jedoch gering im Vergleich zur Wirkung dieser Inhibitoren auf den CREB-induzierten Promotor. Die Western-Analysen waren allerdings ohne Auftragskontrolle durchgeführt worden. Trotzdem kann dies die geringen Effekte der Inhibitoren in den Western-Analysen nicht erklären. Diese Ergebnisse haben somit keine eindeutige Aussage.



**Abb. 48: Hypothetische Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion im PKA-Weg**

LPS aktiviert das für die Synthese von 3'-5'-cAMP verantwortliche Enzym Adenylatzyklase. Von cAMP ist bekannt, dass es die PKA aktiviert, die den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert. CREB ist von großer Bedeutung für die Transkription des IL-1 $\beta$ -Gens. Der enzymatische Gegenspieler der Adenylatzyklase ist die PDE4, die 3'-5'-cAMP hydrolytisch in 5'-AMP spaltet. Der durch die PKA aktivierte Transkriptionsfaktor CREB wird durch das Enzym PP1 dephosphoryliert und in einen inaktiven Zustand überführt.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; CREB = cAMP-response element binding protein; ATP = Adenosintriphosphat; AMP = Adenosinmonophosphat; PKA = Proteinkinase A; PDE4 = Phosphodiesterase 4; PP1 = Proteinphosphatase 1

Die Adenylatzyklase (Abb. 48) ist u.a. LPS-induzierbar und katalysiert im aktiven Zustand die Synthese von cAMP ausgehend von ATP. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben klar gezeigt, dass das Enzym PDE4 eine wesentliche Kontrolle über die Produktion von IL-1 $\beta$  im PKA-Signalweg ausübt. Ebenfalls, wenn möglicherweise auch in etwas geringerem Umfang, übt die PP1 eine Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion aus.

#### 4. Kinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

Die Regulation zur Produktion von TNF $\alpha$  scheint nicht minder vielfältig und abhängig vom Zelltyp zu sein als die Regulation von IL-1 $\beta$ . TNF $\alpha$  wird durch die Stimulation von Makrophagen mit LPS induziert, wobei LPS multiple Formen von NF- $\kappa$ B induzieren kann [Yao et al., 1997; Raabe et al., 1998; Liu et al., 2000].

Aus früheren Arbeiten zur TNF $\alpha$ -Produktion war zudem bekannt, dass die beiden die Adenylatzyklase-aktivierenden Prostaglandine E<sub>1</sub> und E<sub>2</sub> die Cytokinproduktion über einen

cAMP-abhängigen Mechanismus inhibieren [Kunkel et al., 1988; Taffet et al., 1989]. Durch die Zugabe von PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> bzw. dB-cAMP hatten Martin & Dorf [1991] hingegen eine Erhöhung der LPS-induzierten IL-6-Produktion in murinen Makrophagen festgestellt.

#### **4.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von TNF $\alpha$**

Staurosporin, ein allgemeiner Inhibitor von Protein-Kinasen, verringerte die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen deutlich ab einer Inkubationsdauer von 4 und 8 Stunden [Schilling, 2000]. Eine dem Staurosporin vergleichbare Inhibition der TNF $\alpha$ -Produktion konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Zugabe von dB-cAMP gezeigt werden. cAMP könnte an der Induktion möglicherweise die Synthese von NF- $\kappa$ B inhibierender Faktoren beteiligt sein, die die Transkription des TNF $\alpha$ -Gens blockieren [Ollivier et al., 1996]. Durch Arbeiten von Taffet et al. [1989] und Tannenbaum & Hamilton [1989] war bereits bekannt, dass die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation durch cAMP-Analoga und durch Adenylatzyklase/cAMP-erhöhendes PGE<sub>2</sub> inhibiert wird. Durch die Zugabe von dB-cAMP konnte die TNF $\alpha$ -Produktion in BV2-Microglia-Zellen ebenfalls deutlich reduziert werden [Woo et al., 2004]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten unabhängig von der Inkubationsdauer eine durch dB-cAMP vermittelte Reduzierung der TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen um den Faktor 2.

#### **4.2. Einfluss von Rolipram auf die Regulation und Produktion von TNF $\alpha$**

Deutlich war der Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte Produktion des Cytokins TNF $\alpha$  (Abb. 37), da die Zugabe des PDE4-Inhibitors die Produktion von TNF $\alpha$  zwischen 2 und 24 Stunden vollständig inhibierte. Nach den Untersuchungen mit dB-cAMP, das zu einer reduzierten Produktion des Cytokins um den Faktor 2 in Makrophagen geführt hatte, war dieses deutliche Ergebnis sehr überraschend. Vermutlich ist die PDE4 daher von besonderer Bedeutung bei der Produktion von TNF $\alpha$ . Der unterschiedliche Einfluss von dB-cAMP und Rolipram auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen lässt vermuten, dass cAMP zwar wichtige Faktoren der TNF $\alpha$ -Produktion moduliert, dass die PDE4 aber einen Einfluss auf zusätzliche Regulatormoleküle von TNF $\alpha$  ausübt. Nach 2-stündiger Inkubationszeit war die Akkumulation der TNF $\alpha$ -mRNA in LPS-behandelten Zellen bereits deutlich erhöht, blieb bis 8 Stunden auf diesem Niveau und verringerte sich zwischen 8 und 12 Stunden rapide, wobei sie bis 24 Stunden auf diesem erniedrigten Level blieb. Besonders zwischen 2 und 8 Stunden wurde ein Effekt durch Rolipram deutlich sichtbar. In diesem Zeitraum war die mRNA-Akkumulation in Gegenwart von Rolipram nahezu um die Hälfte gegenüber der LPS-Kontrolle verringert. Bemerkenswerterweise hatte Rolipram nach 12 Stunden keinerlei Einfluss auf die mRNA-Akkumulation von TNF $\alpha$  mehr. Trotz noch vorhandener mRNA-Akkumulation war die Protein-Produktion vollkommen inhibiert. Eine Ursache hierfür könnten nicht näher charakterisierte Vorgänge auf der Ebene der Translation sein.



### **4.3. Einfluss von Tautomycin auf die Regulation und Produktion von TNF $\alpha$**

Die Inhibition der PP1 führte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit sowohl zur verstärkten Produktion von IL-1 $\beta$  als auch von TNF $\alpha$ . Die Akkumulation der TNF $\alpha$ -mRNA wurde durch Tautomycin in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen in ähnlicher Weise verstärkt wie die Produktion des TNF $\alpha$ -Proteins. Zwischen 2 und 8 Stunden hatte die Zugabe von Tautomycin keinen Einfluss auf die mRNA-Akkumulation, verstärkte diese aber ab 8 Stunden zunehmend mit steigender Inkubationsdauer. Nach 24 Stunden war die mRNA-Akkumulation von TNF $\alpha$  in LPS-stimulierten Zellen in Gegenwart von Tautomycin um den Faktor 5,6 gegenüber der LPS-Kontrolle erhöht. Es wäre zu erwarten gewesen, dass diese starke Erhöhung der mRNA-Akkumulation auch auf der Ebene der Proteinproduktion sichtbar werden würde, doch betrug die Verstärkung der Proteinproduktion nach 24 Stunden nur etwa das 2-fache. Wiederum sind Kontrollen auf der Ebene der Translation zu vermuten.

NF- $\kappa$ B gilt für die Expression von TNF $\alpha$  als essentiell [Palladino et al., 2003]. Jüngste, bisher unveröffentlichte EMSA-Untersuchungen der Arbeitsgruppe (D. Schilling-Leiß) zeigten jedoch eine deutliche Verstärkung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Tautomycin in LPS-behandelten RAW 264.7-Makrophagen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die durch den PP1-Inhibitor induzierte Erhöhung der TNF $\alpha$ -Produktion auf eine verstärkte Aktivierung von NF- $\kappa$ B zurückzuführen ist.

## **5. Kinetische Studien zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-induzierte Produktion von IL-6 in RAW 264.7-Makrophagen**

Staurosporin vermittelte in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe [Schilling, 2000] eine Erhöhung von IL-6, allerdings nur dann, wenn die Zugabe zu RAW 264.7-Makrophagen nicht zeitgleich mit LPS erfolgte. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass IL-1 $\beta$  und IL-6 differenziert voneinander reguliert werden. Um die Regulation und den zeitlichen Verlauf der IL-6-Produktion besser verstehen zu können, wurde untersucht, ob die Zugabe von dB-cAMP auch die Produktion von IL-6 modulieren würde (Abb. 41).

### **5.1. Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von IL-6**

In Gegenwart von dB-cAMP war bereits ab einer Inkubationsdauer von 4 Stunden die Cytokinproduktion leicht erhöht. Die durch cAMP-vermittelte Verstärkung der IL-6-Produktion verlief bis 24 Stunden relativ gleichmäßig erhöht über den LPS-Kontrollen.

In LPS-stimulierten BV2-Microglia-Zellen hatte die Zugabe von dB-cAMP wenig Einfluss auf die IL-6-Produktion [Woo et al., 2004]. Dagegen inhibierte cAMP die IL-6-Produktion in humanen Lungen-Fibroblasten [Zitnik et al., 1993] und in Endotoxin-behandelten Kupferzellen [Goss et al., 1993]. Der Einfluss von cAMP auf IL-6 scheint Zell-spezifisch zu sein.

### **5.2. Einfluss von Rolipram auf die Produktion von IL-6**

Durch die Zugabe von Rolipram wurde die LPS-induzierte IL-6-Produktion in RAW 264.7-Makrophagen zu jedem Zeitpunkt der kinetischen Studien leicht verringert (Abb. 42). Dies war etwas überraschend, da die Zugabe von cAMP die Produktion von IL-6 verstärkte. Da es nicht zur vollständigen Inhibition des Cytokins durch Rolipram kommt, kann vermutet werden, dass weitere, PDE4-unabhängige Mechanismen an der IL-6-Produktion beteiligt sind. Durch die unterschiedlichen Effekte von Rolipram auf IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 ist davon auszugehen, dass die Regulation dieser Cytokine zumindest in unterschiedlicher Weise von PDE4 abhängig ist.

### **5.3. Einfluss von Tautomycin auf die Produktion von IL-6**

Ebenfalls überraschend war die vollständige Inhibition der IL-6-Produktion durch den PP1-Inhibitor Tautomycin. Dieser Inhibitor hat die LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  verstärkt. Über den gesamten Stimulierungszeitraum hinweg wurde jedoch in Anwesenheit von Tautomycin kein IL-6 durch die LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen produziert. Die Aktivität der PP1 scheint daher von zentraler Bedeutung für die Produktion von IL-6 zu sein.

## **6. Zusammenfassender Überblick über die Regulation der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IL-6**

An der Regulation der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 sind zahlreiche verschiedene Signalkaskaden beteiligt, die einander positiv oder negativ beeinflussen. Erschwerend für die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der Cytokinproduktion kommt die Tatsache hinzu, dass die Vielzahl der untersuchten Zelltypen kein einheitliches Muster der Cytokinproduktion aufweisen und in jedem System die Faktoren in anderer Form miteinander wechselwirken. Bereits durch frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde vermutet, dass die Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 differenziert reguliert werden [Schilling, 2000; Schilling et al., 2001].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Zugabe von dB-cAMP bzw. Rolipram zu einer verstärkten Produktion von IL-1 $\beta$  führte, gleichzeitig jedoch die TNF $\alpha$ -Produktion reduzierte (Tabelle 7). Durch die Inhibition der PP1 aber wurden sowohl die IL-1 $\beta$ - als auch die TNF $\alpha$ -Menge in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen teils deutlich erhöht. Die Regulation zur Produktion von IL-6 scheint demgegenüber vollkommen anders als die Regulation der Cytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  abzulaufen. Durch die Zugabe von dB-cAMP wurde die IL-6-Produktion wie im Falle von IL-1 $\beta$  zwar gesteigert, doch verringerte die Zugabe von Rolipram die LPS-induzierte Cytokinmenge wie im Falle von TNF $\alpha$ . Der PP1-Inhibitor Tautomycin bewirkte hingegen eine vollständige Inhibition der IL-6-Produktion, was in

klarem Gegensatz zur verstärkten Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in Gegenwart von Tautomycin steht. Dies alles waren klare Hinweise darauf, dass die Regulation der Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 weitgehend unterschiedlich voneinander abläuft (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Modulierende Einflüsse von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-stimulierte Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 in RAW 264.7-Makrophagen**

|                   | IL-1 $\beta$ | TNF $\alpha$ | IL-6 |
|-------------------|--------------|--------------|------|
| <b>dB-cAMP</b>    | ↑            | ↓            | ↑    |
| <b>Rolipram</b>   | ↑            | ↓            | ↓    |
| <b>Tautomycin</b> | ↑            | ↑            | ↓    |

Die Tabelle stellt die Einflüsse von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 in RAW 264.7-Makrophagen dar. Ist das jeweilige Feld grau unterlegt, so war die Tendenz der Modulation eindeutig.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; IL = Interleukin; TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; dB-cAMP = dibutyryl-cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat

Nach wie vor gelten PDE4-Inhibitoren bei der Entwicklung von Therapeutika aufgrund ihrer TNF $\alpha$ -senkenden Eigenschaften als hoffnungsvolle Modulatoren bei der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen. Mit Nachdruck wird an der Entwicklung Patienten-verträglicher PDE4-Inhibitoren geforscht [Hartmann et al., 2000; Beshay et al., 2001; Card et al., 2005]. Dass der Einsatz von PDE4-Inhibitoren jedoch kritisch betrachtet werden muss, haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dokumentiert. Zwar wurde durch den Einsatz von Rolipram die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen deutlich gesenkt, doch stieg die Produktion von IL-1 $\beta$  im gleichen Zeitraum dramatisch an, und die Produktion von IL-6 war nicht vollkommen inhibiert. Da die zugrundeliegenden Mechanismen der Cytokinproduktion bislang nur unzureichend bekannt sind, darf die Modulation einzelner Cytokine nicht ohne die gleichzeitige Betrachtung weiterer Entzündungsmediatoren erfolgen. Durch die Vielzahl der involvierten Faktoren wird eine therapeutische Regulierung der Cytokinproduktion erheblich erschwert.

## 7. Überlegungen zur Differenzierung der Signalwege zur Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IL-6

### 7.1. Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren CREB vs. NF- $\kappa$ B für die Produktion proinflammatorischer Cytokine

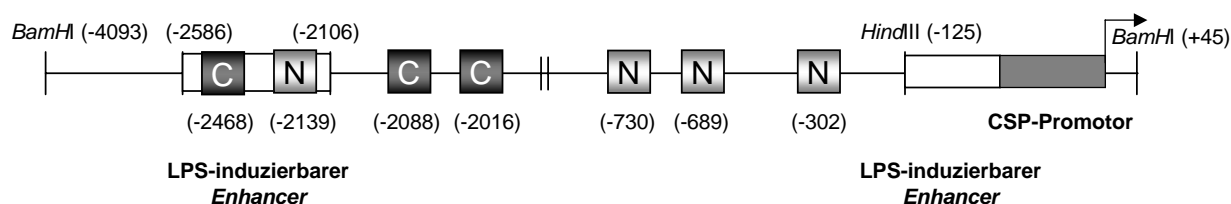
In der Einleitung wurde auf die Bedeutung des CREB-binding proteins (CBP) als Transkriptions-Adaptor für die transkriptionelle Aktivität von CREB hingewiesen. CREB gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression des IL-1 $\beta$ -Gens [Akira & Kishimoto, 1997]. Roach et al. [2005] zufolge ist CREB zudem einer von zahlreichen Transkriptionsfaktoren, die im Promotorbereich des TNF $\alpha$ -Gens binden. Durch

Promotormutations-Studien konnten die Forscher zeigen, dass die CREB-Bindestelle sehr wichtig für die Mycobakterien-induzierte TNF $\alpha$ -Transkription zu sein scheint. Durch Untersuchungen mit THP-1-Zellen ist bekannt, dass die Zugabe von dB-cAMP den Transkriptionsfaktor CREB verstärkt aktiviert [Chandra et al., 1995].

Parry & Mackman [1997] vermuten, dass die Transkriptionsfaktoren CREB und NF- $\kappa$ B womöglich kompetitiv um die vorhandenen CBP-Moleküle in humanen Monocyten und Endothelzellen konkurrieren. Der CBP/p300-Komplex erleichtert vermutlich den Zugang der Transkriptionsfaktoren an den Promotorbereich und macht diesen leichter zugänglich [Berrier et al., 1998; Perkins, 2000]. Durch die von Gray et al. [1993] beschriebene unmittelbare Nähe der Bindestellen von CREB und NF- $\kappa$ B im *Enhancer*- und Promotorbereich des humanen IL-1 $\beta$ -Gens könnte es weiterhin zur Konkurrenz der beiden Transkriptionsfaktoren um ihre DNA-Bindesequenzen kommen. Bszech et al. [2002] hatten in THP-1-Zellen zeigen können, dass eine verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB zu einer verringerten Produktion von TNF $\alpha$  führt. Dieses Ergebnis scheint für LPS-stimulierte RAW 264.7-Makrophagen aufgrund der vorliegenden Untersuchungen ebenfalls zuzutreffen. Mittels ELISA wurde festgestellt, dass die Zugabe von cAMP und Rolipram die TNF $\alpha$ -Produktion vollständig inhibiert. In Western-Analysen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Rolipram die Phosphorylierung von CREB verstärkt. Daher kann Bszech et al. [2002] folgend angenommen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der verstärkten CREB-Phosphorylierung und der Inhibition der TNF $\alpha$ -Produktion geben könnte.

Die Inhibition der MAP-Kinase p38 führt zur Verringerung der Adenosin-vermittelten CREB-Aktivierung [Neméth et al., 2003]. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass neben dem eingehend beschriebenen PKA-Weg womöglich weitere Tyrosinkinase-aktivierte MAP-Kinase-Kinasen und MAP-Kinasen an der Aktivierung von CREB beteiligt sein könnten.

Es ist bekannt, dass LPS die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B induziert [Chen et al., 1998; Kang et al., 2000 b] und die Produktion von TNF $\alpha$  in Makrophagen durch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs erhöht werden kann [Makkonen et al., 1999]. Der Transkriptionsfaktor moduliert die Expression verschiedener Gene, darunter auch IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  [Gray et al., 1993; Rice & Ernst, 1993; Whiteside et al., 1997]. NF- $\kappa$ B gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor der TNF $\alpha$ -Expression [Akira & Kishimoto, 1997; Shakhov et al., 1990]. Nach Bszech et al. [2002] inhibiert das über den PKA-Weg phosphorylierte CREB die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkriptionsaktivität, wobei CREB womöglich die Produktion von NF- $\kappa$ B-inhibierenden Proteinen induziert. In Abb. 48 sind die möglichen Bindestellen von CREB und NF- $\kappa$ B im *Enhancer*- und Promotorbereich des murinen IL-1 $\beta$ -Gens dargestellt. Der LPS-induzierbare *Enhancer* enthält je eine mögliche DNA-Bindestelle für CREB und NF- $\kappa$ B, der Bereich zwischen *Enhancer* und minimalem Promotor 2 bzw. 3 putative Bindestellen für CREB und NF- $\kappa$ B.



**Abb. 49: Mögliche Bindestellen der Transkriptionsfaktoren CREB und NF-κB im Enhancer- und Promotor-Bereich des murinen IL-1β-Gens**

Dargestellt sind die möglichen Bindestellen der Transkriptionsfaktoren CREB (schwarze Kästchen, Beschriftung C) und NF-κB (helle Kästchen, Beschriftung N) im Enhancer- und Promotor-Bereich des murinen IL-1β-Gens (GenBank *accession number* U03987). Durch eine Analyse der Gensequenz mittels des Programms „MatInspector V2.2“ basierend auf TRANSFEC 4.0 auf der Internetseite der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig ([www.transfec.gbf.de](http://www.transfec.gbf.de)) wurden die möglichen Bindestellen ermittelt. Zusätzlich sind die bisher beschriebenen *cis-acting* Elemente im murinen IL-1β-Gen (LPS-induzierbarer Enhancer in weiß; CSP-Promotor in grau) stromaufwärts vom Transkriptionsstart (durch einen Pfeil markiert) dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Position der Basenpaare stromaufwärts (-) oder stromabwärts (+) vom Transkriptionsstart an.

Abkürzungen: C = CRE = CREB-Bindestelle; N = NF-κB-Bindestelle; LPS = Lipopolysaccharid; CSP-Promotor = *cap-site proximal* Promotor

Durch die Zugabe des PP1-Inhibitors Tautomycin kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer Verstärkung der TNFα-mRNA und der TNFα-Produktion. Da die Inhibition der PP1 zu einer deutlichen Verstärkung der TNFα-Produktion führt, kann vermutet werden, dass dieser Effekt auf einer durch Tautomycin inhibierten Dephosphorylierung von NF-κB beruhen könnte.

In bisher unveröffentlichten Untersuchungen konnte D. Schilling-Leiß in *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA)-Untersuchungen einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Tautomycin-vermittelten Inhibition der PP1 und der verstärkten Aktivierung von NF-κB in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen feststellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen durch Sun et al. [1995], denen zufolge Inhibitoren von PP1 und 2A die Phosphorylierung von IκBα induzieren und hierdurch NF-κB in humanen T-Zellen aktivieren.

Die induzierte Phosphorylierung der NF-κB-Inhibitor-Untereinheit IκBα erfolgt an zwei konservierten Serinresten (Ser 32 und Ser 36) der N-terminalen Domäne [Brockman et al., 1995; Brown et al., 1995; DiDonato et al., 1996]. Dieser über Ubiquitinierung und Proteasomenkomplex ablaufende reguläre Weg der NF-κB-Aktivierung wird u.a. durch LPS, *ocadaic acid*, IL-1β und TNFα ausgelöst [Kang et al., 2000; a].

## 8. Untersuchungen zum Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid in RAW 264.7-Makrophagen

Die Zugabe von dB-cAMP hatte geringen Einfluss auf die NO-Produktion in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen. In Gegenwart von Rolipram nahm die produzierte

NO-Menge in LPS-behandelten RAW 264.7-Makrophagen ab 12 Stunden unabhängig von der Inkubationsdauer um die Hälfte ab. Bemerkenswert war die Tatsache, dass Rolipram die NO-Produktion anders modulierte als dB-cAMP. Vermutlich hat Rolipram über die Aktivität der PDE4 im Gegensatz zu dB-cAMP einen deutlicheren Einfluss auf die Produktion von NO. Dennoch scheint die NO-Produktion nicht allein von der Aktivität der PDE4 abhängig zu sein, da der Inhibitor Rolipram die LPS-induzierte NO-Produktion zwar verringerte, aber nicht vollständig inhibierte. Neben der Aktivität der PDE4 ist aller Wahrscheinlichkeit nach also mindestens ein weiterer Faktor beteiligt, der ein Grundlevel der NO-Produktion nach Stimulierung von Makrophagen mit LPS gewährleistet.

Wie auch hinsichtlich der IL-6-Produktion unterdrückte die Zugabe von Tautomycin in der vorliegenden Arbeit die Produktion von NO ab 12 Stunden in Gegenwart von LPS vollständig (Tabelle 8). Daher scheint die Aktivität der PP1 notwendig zu sein für die Produktion von NO und IL-6. Dies würde wiederum erklären, warum NO und IL-6 erst relativ spät gebildet werden: die PP1 ist erst etwa 12 Stunden nach LPS-Stimulierung aktiv.

**Tabelle 8: Modulierender Einfluss von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-stimulierte Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und NO in RAW 264.7-Makrophagen**

|                   | IL-1 $\beta$ | TNF $\alpha$ | IL-6 | NO |
|-------------------|--------------|--------------|------|----|
| <b>dB-cAMP</b>    | ↑            | ↓            | ↑    | ↑  |
| <b>Rolipram</b>   | ↑            | ↓            | ↓    | ↓  |
| <b>Tautomycin</b> | ↑            | ↑            | ↓    | ↓  |

Die Tabelle stellt die Einflüsse von dB-cAMP, Rolipram und Tautomycin auf die LPS-induzierte Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und NO in RAW 264.7-Makrophagen dar. Ist das jeweilige Feld grau unterlegt, so war die Tendenz der Modulation eindeutig.

Abkürzungen: LPS = Lipopolysaccharid; IL = Interleukin; TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ; NO = Stickstoffmonoxid; dB-cAMP = di-buturyl-cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, wie ähnlich die Produktion von IL-6 und NO abläuft. Dies lässt darauf schließen, dass die Mechanismen zur Regulation der beiden Moleküle sehr ähnlich sein könnten. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  sowohl über TLR4- als auch über TLR2-Agonisten in Makrophagen induziert werden. Dagegen kann die Produktion von NO [Toshchakov et al., 2002] und IL-6 [Schilling et al., 2002] nicht durch TLR2-Agonisten angeregt werden. Diese Befunde sprechen auch dafür, dass NO und IL-6 andere Signalwege bzw. -Komponenten verwenden als IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ .

## 9. Kontrollen über die Expression der Cytokingene durch Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen im Zusammenhang mit dem *oxidative burst*

Zusätzlich zu den Kontrollen durch die PDE4 und die PP1, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind die durch den *oxidative burst* ausgeübten regulatorischen Mechanismen zu erwähnen. LPS induziert in Makrophagen den so genannten *oxidative burst* [DeLeo, 1998], der durch die Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) wie Superoxid- und Hydroxylradikale sowie Wasserstoffperoxid charakterisiert ist.

Die NADPH-Oxidase, auch bekannt als *oxidative burst*-Oxidase, gilt als das wichtigste Enzym der induzierbaren ROS-Produktion [Segal & Shatwell, 1997; Babior et al., 2002]. Die Untereinheiten der NADPH-Oxidase finden sich in verschiedenen subzellulären Kompartimenten (im Cytosol, an der Plasmamembran) [Gozal et al., 2001] und lagern sich nach der Translokation der cytosolischen Komponenten aneinander an. Der vollständige Komplex kann die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) katalysieren, aus denen Wasserstoffperoxid entsteht [Babior, 1999; Clark, 1999]. Bastian & Hibbs [1994] zufolge liegt die Aufgabe der NADPH-Oxidase-Produkte vornehmlich in der Abwehr extrazellulärer Pathogene, die sich Zugang zu phagocytischen Zellen verschaffen, wohingegen das durch die iNOS produzierte NO die Abwehr von intrazellulär lebenden und proliferierenden Pathogenen vermittelt.

Durch die Stimulierung von Makrophagen mit LPS werden Tyrosinkinasen aktiviert, die das intrazelluläre *Signaling* einleiten [Weinstein et al., 1991]. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) stellen in ihrer Wirkungsweise die Gegenspieler von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) dar. In ihrem katalytischen Zentrum enthalten PTP ein reaktives, redox-reguliertes Cystein [Andersen et al., 2001; Segal & Shatwell, 1997]. PTP sind nur aktiv, wenn das zentrale Cystein in reduziertem Zustand vorliegt. Wird der Cystein-Rest jedoch durch  $H_2O_2$  oder ein anderes Molekül oxidiert, so liegt das Enzym vollständig inaktiv vor [Reth, 2002]. In humanen THP-1-Zellen beschreiben Ryan et al. [2004] einen durch LPS zeit- und konzentrationsabhängig induzierten *oxidative burst*. Die produzierten ROS, speziell  $H_2O_2$ , inhibieren Protein-Tyrosin-Phosphatasen und aktivieren Protein-Tyrosin-Kinasen, die für die Induktion zahlreicher an der Signalkaskade beteiligter Enzyme verantwortlich sind [Meyer et al., 1993]. Desweiteren induzieren ROS vermutlich die Phosphorylierung von I $\kappa$ B und beeinflussen hierdurch die Aktivität von NF- $\kappa$ B [Simm & Brömme, 2005; Meyer et al., 1993].

Im Falle der PTK und PTP ist es eindeutig, warum die Aktivität der PTP nach einem *oxidative burst* relativ spät eingreift, um eine negative Kontrolle über die Aktivierung der PTK auszuüben. Insofern wäre es interessant zu prüfen, welche Rolle PTPs bei der Regulation der Produktion proinflammatorischer Cytokine spielen.

Die negative Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion durch PDE4 und PP1 wirkt ebenfalls relativ spät (ab 12 Stunden) im Verlauf der Antwort von Makrophagen auf eine Stimulierung mit

LPS. Ob eine Hemmung der Aktivität dieser Enzyme durch die Folgen eines *oxidative burst* entsteht, ist nicht bekannt. Nichtsdestoweniger haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass diese Enzyme nicht aktiv sind, solange eine induktive Phase der Stimulierung abläuft. Möglicherweise spielen auch andere Mechanismen der Enzyminhibition eine Rolle. Hierzu soll das Phosphatase-Inhibitor-Protein erwähnt werden, das als Inhibitor der PP1 eine Verzögerung der nachfolgenden CREB-Phosphorylierung vermittelt [Hagiwara et al., 1992]. Das Protein wird durch einen PKA-abhängigen Mechanismus am Threonin-Rest 35 phosphoryliert und wirkt nachfolgend inhibierend auf die PP1. Es wäre interessant zu prüfen, in wieweit der Inhibitor eine Rolle bei der Regulation der IL-1 $\beta$ -Produktion spielt.

## 10. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Hinweise darauf, dass die Regulation des proinflammatorischen Cytokins IL-1 $\beta$  maßgeblich über den CREB-aktivierenden PKA-Weg erfolgt. Dies wurde deutlich, da Inhibitoren von PDE4 und PP1 die negative Regulation von IL-1 $\beta$  aufhoben und sowohl die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation als auch die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen verstärkten. Die weiteren Befunden sprechen dafür, dass TNF $\alpha$ , IL-6 und NO in anderer Weise reguliert werden und nicht vollständig von der Regulation über PKA abhängig sind.

Da die Regulation des humanen IL-1 $\beta$ -Gens in maßgeblicher Weise an der Region zwischen dem *Enhancer* und dem minimalen Promotor (Nukleinsäureposition -2729 bis -131) zu erfolgen scheint, wird dieser Bereich in weiteren Untersuchungen näher einzugrenzen sein, um die beteiligten Sequenzen und Bindestellen charakterisieren zu können. Da das Entfernen dieser Sequenz zu einer deutlichen Abnahme der Promotoraktivität in Promotoraktivitätsstudien führte (Reportergenkonstrukt pX2-HT-luc, Abb. 16), kann davon ausgegangen werden, dass die in diesem Bereich vorhandenen putativen CREB- bzw. NF- $\kappa$ B-Bindestellen (Abb. 49) für maximale Transkriptionsraten essentiell sind.

Durch die vorliegende Arbeit wurde zudem in Reportergen-Assays der Einfluss von Rolipram und Tautomycin auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB gezeigt. In weiterführenden Zeitkinetik-Experimenten könnte der genaue Zeitpunkt der maximalen CREB-Phosphorylierung bestimmt werden, um nähere Einblicke in die Kinetik der CREB-induzierten, transkriptionellen Abläufe zu gewinnen.

Da bislang eine Konkurrenz zwischen CREB und NF- $\kappa$ B nicht ausgeschlossen werden kann, wäre es in diesem Zusammenhang zudem von Interesse, durch EMSA-Untersuchungen festzustellen, ob Rolipram oder Tautomycin einen aktivierenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B besitzen.

Mit Hilfe von Chromatin-Immunoprecipitation und *formaldehyd crosslink* (ChIP)-Assays könnte zudem die LPS-induzierte Bindung zwischen CREB bzw. NF- $\kappa$ B an den IL-1 $\beta$ - bzw.



TNF $\alpha$ -Promotor untersucht werden, was zudem nähere Aufschlüsse über die an der Genexpression beteiligten Transkriptionsfaktoren liefern würde.

Die Beteiligung von PTK und PTP an den Regulationsmechanismen zur Produktion der untersuchten Cytokine könnte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren erforscht werden.

## VI. Zusammenfassung

Eine positive Eigenschaft der proinflammatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 ist die Regulation der Immunabwehr. Diese Substanzen werden u.a. von Makrophagen produziert, die durch den Kontakt mit dem Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien aktiviert werden. Bei einer dauerhaft verstärkten Produktion dieser inflammatorischen Mediatoren kann es zur Ausbildung von chronischen Entzündungserkrankungen kommen, weshalb es von zentraler Bedeutung ist, die Regulation der Cytokinproduktion zu verstehen, um geeignete Therapeutika zur Behandlung dieser Krankheiten entwickeln zu können.

Die Induktion zur Expression des IL-1 $\beta$ -Gens erfolgt in LPS-stimulierten Makrophagen rapide, aber transient. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine negative Regulation von IL-1 $\beta$  erst 8 bis 12 Stunden nach LPS-Stimulierung von murinen Makrophagen einsetzt. Diese Regulation wurde hauptsächlich auf der Ebene der Transkription ausgeübt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen dieser Kontrolle in LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen näher untersucht. Durch Hinweise in der Literatur wurde vermutet, dass diese Kontrolle womöglich im Protein-Kinase A (PKA)-Weg ausgeübt wird. Da cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) von großer Bedeutung innerhalb dieses Signalweges ist, wurde zunächst exogenes cAMP als Modulator des PKA-Weges eingesetzt. Die zwischen 8 und 12 Stunden nach LPS-Stimulierung erstmals zu beobachtende negative Regulation von IL-1 $\beta$  konnte durch die Zugabe exogenen cAMPs aufgehoben werden. Die mRNA-Akkumulation und die Produktion von IL-1 $\beta$  wurden hierdurch deutlich verstärkt.

Die Bedeutung weiterer für die Produktion von IL-1 $\beta$  möglicherweise wichtiger Regulationsstellen im PKA-Weg wurde durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren untersucht. Durch den Einsatz von Rolipram, einem spezifischen Inhibitor der PDE4, die das intrazelluläre cAMP-Level kontrolliert, wurde die LPS-induzierte negative Regulation von IL-1 $\beta$  ab 12 Stunden aufgehoben. Die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation und -Produktion wurden ebenfalls deutlich verstärkt. Es wurde desweiteren vermutet, dass die Proteinphosphatase 1 (PP1), die den Transkriptionsfaktor CREB dephosphoryliert, eine weitere Kontrolle über die IL-1 $\beta$ -Produktion im PKA-Weg ausüben könnte. Wie bei der Verwendung von Rolipram wurde durch den PP1-Inhibitor Tautomycin die negative Regulation von IL-1 $\beta$  ab 12 Stunden nach LPS-Stimulierung aufgehoben und sowohl die IL-1 $\beta$ -Produktion als auch die mRNA-Akkumulation verstärkt.

Die PDE4 und die PP1 scheinen an der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  zudem auf der Ebene der Promotor-Aktivität beteiligt zu sein, wie durch Transfektionsversuche mit IL-1 $\beta$ -Promotor-Reportergen-Konstrukten gezeigt werden konnte. Im Verlauf der Arbeit wurde deutlich, dass der Bereich zwischen dem *Enhancer* und dem minimalen Promotor des IL-1 $\beta$ -Gens womöglich wesentlich für die negative IL-1 $\beta$ -Regulation ist.

Da in der Literatur vielfach auf die Bedeutung des PKA-aktivierbaren Transkriptionsfaktors CREB für die IL-1 $\beta$ -Produktion hingewiesen worden war, sollte eingehender untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Aufhebung der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  und dem Aktivierungszustand von CREB besteht. Tatsächlich führten Rolipram und Tautomycin in Reporter-Gen-Assays auch zur verstärkten Aktivierung eines CREB-abhängigen Promotors.

Die TNF $\alpha$ -Produktion wurde in anderer Weise durch die eingesetzten Modulatoren verändert. Da Rolipram die LPS-stimulierte Produktion von TNF $\alpha$  vollständig inhibierte, wohingegen Tautomycin die TNF $\alpha$ -Produktion verstärkte, war dies ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass die Regulation von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  differenziert voneinander erfolgt. Durch den Einsatz von Tautomycin wurden sowohl die IL-1 $\beta$ - als auch die TNF $\alpha$ -Produktion verstärkt, wobei der PP1-Inhibitor jedoch die Produktion von IL-6 und NO vollständig unterdrückte. Die Aktivität der PP1 scheint daher essentiell für die Produktion von NO und IL-6 zu sein. NO und IL-6 werden zwar erst relativ spät nach LPS-Stimulierung gebildet, doch lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass die PP1 erst ab 12 Stunden nach LPS-Stimulierung in aktivierter Form vorliegt und dies im Zusammenhang mit der negativen Regulation von IL-1 $\beta$  stehen könnte.

Die vielfältigen Effekte der PDE4 und der PP1 auf die Regulation und Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und NO im Rahmen dieser Arbeit dokumentieren deutlich die Komplexität der intrazellulären Signaltransduktionswege nach LPS-Aktivierung.

## VI. Summary

A positive feature of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 is the regulation of immune defense processes. These cytokines are produced by several cells, among them macrophages, which are activated by contact with the lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria. A persistent overproduction of these inflammatory mediators can lead to the development of chronic inflammatory diseases. Therefore, it is of central interest to understand the regulation of cytokine production. With this knowledge it may be possible to design new therapeutic measures for the successful treatment of these diseases.

The expression-induction of the IL-1 $\beta$ -gene in LPS-stimulated macrophages is rapid but transient. Earlier investigations of our research group could show that a negative regulation of IL-1 $\beta$  in murine macrophages can first be observed beginning 8 to 12 hours after LPS-activation. This effect was regulated to a great extent at the level of transcription.

In the present study the mechanisms of this control in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages were investigated further. Some indications in the literature suggested that this control might be exerted within the protein-kinase A (PKA) pathway. In this pathway cyclic adenosine monophosphate (cAMP) plays a key role. Therefore, exogenous cAMP was applied as a modulator of the PKA-pathway in first experiments. The negative regulation of IL-1 $\beta$ , which was first observed between 8 and 12 hours after LPS-stimulation, could be released by the addition of exogenous cAMP. The accumulation of mRNA and the production of IL-1 $\beta$  were greatly enhanced.

The relevance of further, possibly important regulation points for the production of IL-1 $\beta$  within the PKA-pathway was investigated by the use of specific inhibitors. Rolipram, a specific inhibitor of phosphodiesterase (PDE) 4, which controls the intracellular cAMP-level, mediated the enhancement of the LPS-induced negative regulation of IL-1 $\beta$  starting 12 hours after application. At the same time, IL-1 $\beta$  mRNA accumulation was also significantly enhanced. It was further reasoned that protein phosphatase (PP) 1, which phosphorylates the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB), might also exercise an important control on IL-1 $\beta$ -production in the PKA-pathway. This was investigated using the specific PP1 inhibitor tautomycin. Comparable to the effects caused by rolipram, tautomycin released the negative regulation of IL-1 $\beta$  production starting 12 hours after LPS-stimulation and enhanced IL-1 $\beta$  mRNA accumulation as well.

The results of experiments in which macrophages were transfected with IL-1 $\beta$ -promotor-reporter gene constructs showed that PDE4 and PP1 regulate IL-1 $\beta$  production at the level of transcription. In the course of this thesis it became apparent that the genetic sequence between the enhancer and the minimal promotor of the IL-1 $\beta$ -gene is essential for the negative regulation of IL-1 $\beta$ . The importance of the transcription factor CREB for IL-1 $\beta$ -production has been stressed in the literature. Therefore, the ability of PDE4 and PP1 to influence the activation state of CREB was subsequently investigated. Indeed, rolipram and tautomycin

both mediated a greatly enhanced activation of CREB-dependent promoters in reporter gene assays.

The production of  $\text{TNF}\alpha$  was affected in a different manner by PDE4 and PP1. Rolipram inhibited the LPS-stimulated production of  $\text{TNF}\alpha$  completely, while tautomycin enhanced  $\text{TNF}\alpha$  production. These results provide additional indication that  $\text{IL-1}\beta$  and  $\text{TNF}\alpha$  are regulated differently. Furthermore, the LPS-induced production of IL-6 and NO were completely suppressed by tautomycin. The activity of PP1 seems therefore to be essential for the production of NO and IL-6. NO and IL-6 are produced relatively late after LPS-stimulation. Results of experiments concerned with the negative regulation of  $\text{IL-1}\beta$  suggest that PP1 is first active starting at 12 hours after LPS-stimulation, and this might be relevant for the somewhat delayed production of IL-6 and NO.

The multiple effects of PDE4 and PP1 on the regulation and production of  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 and NO in the context of this thesis emphasize the apparent complexity of intracellular signal transduction pathways in LPS-activated macrophages.

## VII. Literaturangaben

**Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober.** 2000. Cellular and molecular immunology. 4<sup>th</sup> edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

**Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober.** 1997. Cellular and molecular immunology. 3<sup>rd</sup> edition. Harcourt Brace & Company, Philadelphia.

**Aggarwal, B.B., W.J. Kohr, P.E. Hass, B. Moffat, S.A. Spencer, W.J. Henzel, T.S. Bringmann, G.E. Nedwin, D.V. Goeddel, and R.N. Harkins.** 1985. Human tumor necrosis factor: production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**: 2345-2354.

**Akira, S.** 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**: 5-11.

**Akira, S. & T. Kishimoto.** 1997. NF-IL-6 and NF- $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Adv. Immunol.* **65**: 1-46.

**Akira, S. & K. Takeda.** 2004. Toll-like signaling. *Nature Immunol.* **4**: 499-511.

**Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, und J.D. Watson.** 1995. Molekularbiologie der Zelle, 3.Auflage. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

**Alley, E.W., X. Zhang, and S.W. Russell.** 1994. Contribution of clonally distinct subpopulations to heterogeneous production of inducible nitric oxide synthase by LPS-stimulated mouse macrophages. *J. Endotoxin Res.* **1**: 235.

**Andersen, J.N., O.H. Mortensen, G.H. Peters, P.G. Drake, L.F. Iversen, O.H. Olsen, P.G. Jansen, H.S. Andersen, N.K. Tonks, and N.P. Møller.** 2001. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 7117-7136.

**Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nüsslein-Vollhard.** 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**: 791-798.

**Arch, R.H., R.W. Gedrich, and C.B. Thompson.** 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulate life and death. *Genes Dev.* **12**: 2821-2830.

**Auron, P.E. & A.C. Webb.** 1994. Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 573-592.

**Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (ed.).** 1995. Current protocols in molecular biology, John Wiley and sons, Inc., New York, N.Y.

**Babior, B.M., J.D. Lambeth, and W. Nauseef.** 2002. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 342-344.

**Babior, B.M.** 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**: 1464-1476.

**Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte.** 1973. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**: 741-744.

**Baranzini, S.E., C. Elfstrom, S.Y. Chang, C. Butunoi, R. Murray, R. Higuchi, and J.R. Oksenberg.** 2002. Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J. Immunol.* **165**: 6576-6582.

**Barton, B.E., J. Shortall, and J.V. Jackson.** 1996. Interleukins-6 and -11 protect mice from mortality in a staphylococcal endotoxin-induced toxic shock model. *Infect. Immun.* **64**: 714-718.

**Barton, G.M. & R. Medzhitov.** 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**: 1524-1525.

**Bastian, N.R. & J.B. Hibbs, Jr.** 1994. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 131-139.

**Bauerle, P.A. & V.R. Baichwal.** 1997. NF- $\kappa$ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* **65**: 111-137.

**Bensi, G., M. Moran, G. Raugei, D. Tornese-Buonamassa, M. Rossini, and M. Melli.** 1990. An inducible enhancer controls the expression of the human interleukin-beta gene. *Cell Growth Differ.* **1**: 491-497.

**Berrier, A., G. Siu, and K. Calame.** 1998. Transcription of a minimal promoter from the NF-IL6 gene is regulated by CREB/ATF and SP1 proteins in U937 promycytic cells. *J. Immunol.* **161**: 2267-2275.

**Beshay, E., F. Croze, and G.J. Prud'homme.** 2001. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. *Clin. Immunol.* **98**: 272-279.

**Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

**Brasier, A.R. & J.F. Fortin.** 1995. Nonisotopic assays for reporter gene activity. Firefly luciferase reporter gene assay. p. 9.7.12-9.7.21. In F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and sons, Inc., New York, N.Y.

**Brauburger, J.** 1996. Untersuchungen zur Signaltransduktion in Makrophagen nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid und Protein A aus der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Dissertation, TH Darmstadt.

**Bredt, D.S. & S.H. Snyder.** 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 175-195.

**Brockman, J.A., D.C. Scherer, T.A. McKinsey, S.M. Hall, X. Qi, W. Young Lee, and D.W. Ballard.** 1995. Coupling of a signal response domain in I $\kappa$ B $\alpha$  to multiple pathways for NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2809-2818.

**Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, G. Franzoso, and U. Siebenlist.** 1995. Control of I $\kappa$ B- $\alpha$  proteolysis by site-specific signal-induced phosphorylation. *Science* **267**: 1485-1488.

**Bshech, K., B. Zhao, D. Spight, I. Biaggioni, I. Feokistov, A. Denenberg, H.R. Wong, and T.P. Shanley.** 2002. The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP1-cells. *J. Leuk. Biol.* **72**: 1027-1036.

**Bufler, P., F. Gamboni-Robertson, T. Azam, S.-H. Kim, and C.A. Dinarello.** 2004. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. **381**: 503-510.

**Buras, J.A., B.C. Monks, and M.J. Fenton.** 1994. The NF- $\beta$ A-binding element, not an overlapping NF-IL-6 binding element, is required for maximal IL-1 $\beta$  gene expression. *J. Immunol.* **152**: 4444-4454.

**Campbell, N.A.** 1997. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

**Canaves, J.M. & S.S. Taylor.** 2002. Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J. Mol. Evol.* **54**: 17-29.

**Card, G.L., L. Blasdel, B.P. England, C. Zhang, Y. Suzuki, S. Gillette, D. Fong, P.N. Ibrahim, D.R. Artis, G. Bollag, M.V. Milburn, S.H. Kim, J. Schlessinger, and K.Y. Zhang.** 2005. A family of phosphodiesterase inhibitors discovered by cocrystallography and scaffold-based drug design. *Nat. Biotechnol.* **23**: 201-207.

**Carrieri, P.B., A. Maiorino, V. Provitera, E. Soscia, and O. Perrella.** 1992. Cytokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Acta Neurol. (Napoli)* **14**: 333-341.

**Cavalli-Sforza, L.** 1980. Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

**Chandra, G., J.P. Cogswell, L.R. Miller, M.M. Godlevski, S.W. Stinnett, S.L. Noel, S.H. Kadwell, T.A. Kost, and J.G. Gray.** 1995. Cyclic AMP signaling pathways are important in IL-1 $\beta$  transcriptional regulation. *J. Immunol.* **155**: 4535-4543.

**Chantôme, A., A. Pance, N. Gauthier, D. Vandroux, J. Chenu, E. Solary, J.-F. Jeannin, and S. Reveneau.** 2004. Casein kinase II-mediated phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 subunit enhances inducible nitric oxide synthase gene transcription *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **279**: 23953-23960.

**Chen, A.E., D.D. Ginty, and C.-M. Fan.** 2005. Protein kinase A signaling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* **433**: 317-322.

**Chen, J.-C., K.-C. Huang, B. Wingerd, W.-T. Wu, and W.-W. Lin.** 2004. HMG-CoA reductase inhibitors induce COX-2 gene expression in murine macrophages: role of MAPK cascades and promoter elements for CREB and C/EBP $\beta$ . *Exp. Cell. Res.* **301**: 305-319.

**Chen, F., Y. Lu, L.M. Demers, Y. Rojanasakul, X. Shi, V. Vallyathan, V. Castranova.** 1998. Role of hydroxyl radical in silica-induced NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **28**: 1-13.

**Cheng, J.B., J.W. Watson, C.J. Pazoles, J.D. Eskra, R.J. Griffiths, V.L. Cohan, C.R. Turner, H.J. Showell, and E.R. Pettipher.** 1997. The phosphodiesterase type 4 (PDE4) inhibitor CP-80,633 elevates plasma cyclic AMP levels and decreases tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) production in mice: Effect of adrenalectomy. *Dep. of Cancer, Pfitzer Inc., Groton, Connecticut.* **280**: 621-626.

**Chomczynski, P. & N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

**Chrivia, J.C., R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy, and R.H. Goodman.** 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855-859.

**Clark, R.A.** 1999. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* **179**: S309-S317.

**Cobb, M.H. & E.J. Goldsmith.** 1995. How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14846.

**Collart, M.A., P. Baeuerle, and P. Vassalli.** 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1498-1506.

**Connor, T.J. & B.E. Leonard.** 1998. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci.* **62**: 583-606.

**Contel, C., N. Termine, D.J. Charron, and M.A. Parant.** 1993. Modulation of lipopolysaccharide-induced cytokine gene expression in mouse bone marrow-derived macrophages by muramyl dipeptide. *J. Immunol.* **150**: 4541-4549.

**Coutinho, A., L. Forni, F. Melchers, and T. Watanabe.** 1977. Genetic defect in responsiveness to the B cell mitogen lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* **7**: 325-328.

**Croen, K.D.** 1993. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J. Clin. Invest.* **91**: 2446-2452.

**Csonga, R., E.E. Prieschl, D. Jaksche, V. Novotny, and T. Baumruker.** 1998. Common and distinct signaling pathways mediate the induction of TNF-alpha and IL-5 in IgE plus antigen-stimulated mast cells. *J. Immunol.* **160**: 273-283.

**Deak, M., A.D. Clifton, J.M. Lucocq, and D.R. Alessi.** 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* **17**: 4426-4441.



- DeFranco, A., M.T. Crowley, A. Finn, J. Hambleton, and S.L. Weinstein.** 1998. The role of tyrosine kinases and MAP kinases in LPS-induced signaling, p. 119-136, *In*: J. Levin, M. Pollack, T. Yokochi, M. Nakano (ed.), Endotoxin and sepsis. Molecular mechanisms of pathogenesis, host resistance and therapy. Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y.
- DeLeo, F.R.** 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin. Invest.* **101**: 455-463.
- DiDonato, J., F. Mercurio, C. Rosette, J. Wu-Li, H. Suyang, S. Ghosh, and M. Karin.** 1996. Mapping of the inducible I $\kappa$ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1295-1304.
- Eissa, N.T., J.W. Yuan, C.M. Haggerty, E.K. Choo, C.D. Palmer, and J. Moss.** 1998. Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: a domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7625-7630.
- Finkel, T.** 1999. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **65**: 337-340.
- Fitzgerald, K.A., E.M. Palsson-McDermott, A.G. Bowie, C.A. Jefferies, A.S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, and M.T. Harte.** 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**: 78.
- Foley, E. & P.H. O'Farrell.** 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev.* **17**: 115-125.
- Forman, H.J., M. Torres, and J. Fukuto.** 2002. Redox signaling. *Mol. Cell. Biochem.* **235**: 49-62.
- Ganster, R.W. & D.A. Geller.** 2000. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology (Ignarro, L.J., ed.). Academic Press, San Diego, USA.
- Geng, Y., B. Zhang, and M. Lotz.** 1993. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J. Immunol.* **151**: 6692-6700.
- Ghosh, S. & M. Karin.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**: S 81-96.
- Gmeiner, J.** 1975. The isolation of two different LPS fractions from various *Proteus mirabilis* strains. *Eur. J. Biochem.* **58**: 621-626.
- Godambe, S.A., D.D. Chaplin, T. Takova, L.M. Read, and C.J. Bellone.** 1995. A novel cis-acting element required for lipopolysaccharide-induced transcription of the murine interleukin-1 $\beta$  gene. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 112-119.
- Godambe, S.A., D.D. Chaplin, T. Takova, and C.J. Bellone.** 1994. Upstream NF-IL6-like site located within a DNase I hypersensitivity region mediates LPS-induced transcription of the murine interleukin-1 $\beta$  gene. *J. Immunol.* **153**: 143-152.
- Goncalves de Moraes, V.L., M. Singer, B.B. Vargaftig, and M. Chignard.** 1998. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br. J. Pharmacol.* **123**: 631-636.
- Gonzales, G.A. & M.R. Montminy.** 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**: 675-680.
- Goss, J.A., M.J. Mangino, M.P. Callery, and M.W. Flye.** 1993. Prostaglandin E<sub>2</sub> downregulates Kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **264**: G601-G608.

**Gottschalk, G.** 1986. Bacterial Metabolism. 2<sup>nd</sup> edition, Springer-Verlag, New York, USA

**Gozal, E., H.J. Forman, and M. Torres.** 2001. ADP stimulates the respiratory burst without activation of Erk and Akt in rat alveolar macrophages. *Free Radical Biol. Med.* **31**: 679-687.

**Gray, J.G., G. Chandra, W.C. Clay, S.W. Stinnett, S.A., Haneline, J.J. Lorenz, I.R. Patel, G.B. Wisely, P.J. Furdon, J.D. Taylor et al.** 1993. A CRE/ATF-like site in the upstream regulatory sequence of the human interleukin 1 beta gene is necessary for induction in U937 and THP-1 monocytic cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6678-6689.

**Greten, T.F., A. Eigler, B. Sinha, J. Moeller, and S. Endres.** 1995. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram differentially regulates the proinflammatory mediators TNF-alpha and nitric oxide. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**: 605-610.

**Griffiths, R.J., E.J. Stam, J.T. Downs, and I.G. Otterness.** 1995. ATP induces release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *J. Immunol.* **154**: 2821-2828.

**Griscavage, J.M., S. Wilk, and L.J. Ignarro.** 1996. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 3308-3312.

**Guzowski, J.F. & J.L. McGaugh.** 1997. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2693-2698.

**Hagiwara, M., A. Alberts, P. Brindle, J. Meinkoth, J. Feramisco, T. Deng, M. Karin, S. Shenolikar, and M. Montminy.** 1992. Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**: 105-113.

**Hale, A.J., C.A. Smith, L.C. Sutherland, V.E. Stoneman, V.L. Longthorne, A.C. Culhane, and G.T. Williams.** 1996. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* **236**: 1-26.

**Hartmann, G., C. Bidlingmaier, B. Siegmund, S. Albrich, J. Schulze, K. Tschoep, A. Eigler, H.A. Lehr, and S. Endres.** 2000. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **292**: 22-30.

**Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson.** 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**: 269-278.

**Hatzigeorgiou, D.E., J. Geng, G. Zhu, Y. Zhang, K. Lin, W.N. Rom, M.J. Fenton, S.J. Turco, and J.L. Ho.** 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin-1 $\beta$  gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14708-14713.

**Haziot, A., E. Ferrero, F. Kontgen, N. Hijiya, S. Yamamoto, J. Silver, C.L. Stewart, and S.M. Goyert.** 1996. Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* **4**: 407-414.

**Hershko, D.D., B.W. Robb, G. Luo, and P.-O. Hasselgren.** 2002. Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **283**: R1140-R1148.

**Herzyk, D.J., J.N. Allen, C.B. Marsh, and M.D. Wewers.** 1992. Macrophage and monocyte IL-1 $\beta$  regulation differs at multiple sites. Messenger RNA expression, translation and post-translational processing. *J. Immunol.* **149**: 3052-3058.

**Hogquist, K.A., M.A. Nett, E.R. Unanue, and D.D. Chaplin.** 1991. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8485-8489.

**Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov.** 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**: 835-841.

**Horng, T., G.M. Barton, R.A. Flavell, and R. Medzhitov.** 2002. The adapter molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**: 329-333.

**Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* **162**: 3749-2752.

**Iwahashi, H., A. Takeshita, and S. Hanazawa.** 2000. Prostaglandin E2 stimulates AP-1-mediated CD14 expression in mouse macrophages via cyclic AMP-dependent protein kinase J. *Immunol.* **164**: 5403-5408.

**Jeon, Y.J., S.H. Han, Y.W. Lee, M. Lee, K.H. Yang, and H.M. Kim.** 2000. Dexamethasone inhibits IL-1 $\beta$  gene expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by blocking NF- $\kappa$ B/Rel and AP-1 activation. *Immunopharmacol.* **48**: 173-183.

**Jessop, J.J. & T. Hoffman.** 1993. Production and release of IL-1 $\beta$  by human peripheral blood monocytes in response to diverse stimuli: possible role of "microdamage" to account for unregulated release. *Lymphokine Cytokine Res.* **12**: 51-58.

**Jimenez, J.L., C. Punzón, J. Navarro, M.A. Munoz-Fernández, and M. Fresno.** 2001. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor of activated T cells activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**: 753-759.

**Jin S.L. & M. Conti.** 2002. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF- $\alpha$  responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7628-7633.

**Kang, J.L., I.S. Pack, S.M. Hong, H.S. Lee, and V. Castranova.** 2000 a. Silica induces nuclear factor- $\kappa$ B activation through tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in RAW 264.7 macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **169**: 59-65.

**Kang, J.L., Y.H. Go, K.C. Hur, and V. Castranova.** 2000 b. Silica-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation: Involvement of reactive oxygen species and protein tyrosine kinase activation. *J. Toxicol. Environ. Health* **60**: 27-46.

**Karin, M.** 1994. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**: 415-424.

**Karin, M. & M. Delhase.** 2000. The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signaling. *Semin. Immunol.* **12**: 85-98.

**Karin, M. & T. Hunter.** 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5**: 747-757.

**Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**: 115-122.

**Kawamura, T., S.-I. Matsuzawa, Y. Mizuno, K. Kikuchi, H. Oikawa, M. Oikawa, M. Ubukata, and A. Ichihara.** 1998. Different moieties of tautomycin involved in protein phosphatase inhibition and induction of apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 995-1003.

**Kern, J.A., R.J. Lamb, J.C. Reed, R.P. Daniele, and P.C. Nowell.** 1988. Dexamethasone inhibition of interleukin-1 $\beta$  production by human monocytes. *J. Clin. Invest.* **81**: 237-244.

**Kilbourn, R.G. & O.W. Griffith.** 1992. Inhibition of inducible nitric oxide synthase with inhibitors of tetrahydrobiopterin biosynthesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**: 1938.

**Kim, H.-J., J. Hart, N. Knatz, M.W. Hall, and M.D. Wewers.** 2004. Janus kinase 3 down-regulates lipopolysaccharide-induced IL-1 $\beta$ -converting enzyme activation by autocrine IL-10. *J. Immunol.* **172**: 4948-4955.

**Kim, C., N.-H. Xuong, and S.T. Taylor.** 2005. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RI $\alpha$ ) subunits of PKA. *Science* **307**: 690-696.

**Klein, J.** 1991. *Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

**Knopf, H.-P., F. Otto, R. Engelhardt, M.A. Freudenberg, C. Galanos, F. Herrmann, and R.R. Schumann.** 1994. Discordant adaptation of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL 953. *J. Immunol.* **153**: 287-299.

**Knudsen, P.J., C.A. Dinarello, and T.B. Strom.** 1986. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* **137**: 3189-3194.

**Knudsen, P.J., C.A. Dinarello, and T.B. Strom.** 1987. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J. Immunol.* **139**: 4129-4134.

**Kominato, Y., D.L. Galson, W.R. Waterman, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1995. Monocyte expression of the human prointerleukin 1 $\beta$  gene (IL-1 $\beta$ ) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 85.

**Korzus, E., J. Torchia, D.W. Rose, L. Xu, R. Kurakawa, E.M. McInerney, T.M. Mullen, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld.** 1998. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* **279**: 703-707.

**Kovacs, E.J., D. Radzioch, H.A. Young, and L. Varesio.** 1988. Differential inhibition of IL-1 and TNF- $\alpha$  mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J. Immunol.* **141**: 3101-3105.

**Kovarik, P., D. Stoiber, M. Novy, and T. Decker.** 1998. Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J.* **17**: 3660-3668.

**Krauss, G.** 2003. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

**Krauss, G.** 1997. *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. 1. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim.

**Kriegler, M.** 1990. *Gene transfer and expression. A laboratory manual*. Stockton Press, New York, N.Y.

**Kroczek, R.A. & E. Siebert.** 1990. Optimization of northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization and ultraviolet fixation. *Anal. Biochem.* **184**: 90-95.

**Kronfeld, K.** 1998. Einfluss der Inhibitoren Genistein und Staurosporin auf die Signaltransduktion Lipopolysaccharid-stimulierter Makrophagen. Diplomarbeit, TU-Darmstadt.

**Kunkel, S.A., M. Spengler, M.A. May, R. Spengler, J. Larrick, and D.J. Remik.** 1988. Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *Biol. Chem.* **263**: 5380-5384.

**Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 681-685.

**Lalli, E. & P. Sassone-Corsi.** 1994. Signal transduction and gene regulation: The nuclear response to cAMP. *J. Biol. Chem.* **269**: 17359-17362.

**Lazzeri, N., M.G. Belvisi, H.J. Patel, M.H. Yacoub, K.F. Chung, and J.A. Mitchell.** 2001. Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and cAMP elevating drugs on GM-CSF release by cultured human airway smooth muscle cells. Relevance to asthma therapy. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **24**: 44-48.

**Lee, S.W., A.P. Tsou, H. Chan, J. Thomas, K. Petrie, E.M. Eugui, and A.C. Allison.** 1988. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin-1 $\beta$  and decrease the stability of interleukin-1 $\beta$  mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1204-1208.

**Lee, J.D., V. Kravchenko, T.N. Kirkland, J. Hahn, N. Mackman, A. Moriarty, D. Leturcq, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch.** 1993. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD 14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9930-9934.

**Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney, and H. Boedtker.** 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.

**Lindl, T. & J. Bauer.** 1987. *Zell- und Gewebekultur*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.

**Liu, B. & R.L. Whisler.** 1998. Transcriptional activation and redox regulation of the tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter in human T cells: role of the CRE/ $\kappa$ 3 promoter region. *J. Interferon Cytokine Res.* **18**: 999-1007.

**Liu, J., M. Chen, and X. Wang.** 2000. Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. *Immunol.* **101**: 61-67.

**Liu, W., J.E. Sheppeck, D.A. Colby, H. Huang, A.C. Nairn, and A.R. Chamberlin.** 2002. The selective inhibition of phosphatases by natural toxins: the anhydride domain of tautomycin is not a primary factor in controlling PP 1/2A selectivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 1597-1600.

**Lowenstein, C.J., E.W. Alley, P. Raval, A.M. Snowman, S.H. Snyder, S.W. Russell, and W.J. Murphy.** 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 9730-9734.

**Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der Hoek, and L. van Alphen.** 1975. Electrophoretic resolution of the „major outer membrane protein“ of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS-Letters* **58**: 254-258.

**Luheshi, G.N., A. Stefferl, A.V. Turnbull, M.J. Dascombe, S. Brouwer, S.J. Hopkins, and N.J. Rothwell.** 1997. Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF- $\alpha$  in the rat. *Am. J. Physiol.* **272**: R862-868.

**MacKintosh, C. & S. Klumpp.** 1990. Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. *FEBS Lett.* **277**: 137-140.

**MacMicking, J., Q.-W. Xie, and C. Nathan.** 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.

**Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker.** 1997. *Brock: Biology of Microorganisms*. 8<sup>th</sup> Edition. Prentice-Hall, Inc. Simon & Schuster / A Viacom Company Upper Saddle River, New Jersey, USA.

**Maldve, R.E., Y. Kim, S.J. Muga, and S.M. Fischer.** 2000. Prostaglandin E (2) regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J. Lipid Res.* **41**: 873-881.

**Makkonen, N., A. Salminen, M.J. Rogers, J.C. Frith, A. Urtti, E. Azhayeva, and J. Monkkonen.** 1999. Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur. J. Pharm. Sci.* **8** : 109-118.

**Mannick, J.B.** 1995. The antiviral role of nitric oxide. *Res. Immunol.* **146**: 693-697.

**Manthey, C.L., M.E. Brandes, P.Y. Perera, and S.N. Vogel.** 1992. Taxol increases steady-state levels of lipopolysaccharide-inducible genes and protein-tyrosine phosphorylation in murine macrophages. *J. Immunol.* **149**: 2459-2465.

**Martin, C.A. & M.E. Dorf.** 1990. Interleukin-6 production by murine macrophage cell lines P388D1 and J774.1: stimulation requirements and kinetics. *Cell. Immunol.* **128**: 555-568.

**Martino, G., F. Grohovaz, E. Brambilla, F. Codazzi, A. Consiglio, E. Clementi, M. Filippi, G. Comi, and L.M. Grimaldi.** 1998. Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* **43**: 340-349.

**Mayr, B.M., G. Canettieri, and M.R. Montminy.** 2001. Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10936-10941.

**Meng, F. & C.A. Lowell.** 1997. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr and Lyn. *J. Exp. Med.* **185**: 1661-1670.

**Meyer, M., R. Schreck, and P.A. Baeuerle.** 1993. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**: 2005-2015.

**Michel, T., Q.W. Xie, and C. Nathan.** 1995. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. *Methods in nitric oxide research*. M. Feelish and J.S. Stamler (eds.). John Wiley & Sons, New York, 161-175.

**Mishell, B.B. & S.M. Shügi.** 1980. *Selected methods in cellular immunology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA.

**Mitsuhashi, S., H. Shima, N. Tanuma, N. Matsuura, M. Takekawa, T. Urano, T. Kataoka, M. Ubukata, and K. Kikuchi.** 2003. Usage of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **278**: 82-88.

**Miyamoto, S., M. Masatoshi, M.J. Schmitt, M. Hatanaka, and I.M. Verma.** 1994. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  is a signal for its degradation but not dissociation from NF- $\kappa$ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12740-12744.

**Morgan, S.J. & D.C. Darling.** 1994. *Kultur tierischer Zellen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

**Morrison, D.C. & J.L. Ryan.** 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.* **38**: 417-432.

**Mueller, H.** 1998. Tumor necrosis factor as an antineoplastic agent: pitfalls and promises. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 1291-1298.

**Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake.** 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* **3**: 667-672.

**Nakajima, T., A. Fukamizu, J. Takahashi, F.H. Gage, T. Fisher, J. Blenis, and M.R. Montminy.** 1996. The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* **86**: 465-474.

**Nathan, C.F.** 1987. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**: 319-326.

**Nathan, C.** 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051-3064.

**Nathan, C. & J.B. Hibbs, Jr.** 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 65-70.

**Natoli, G., S. Sacconi, D. Bosisio, and I. Marazzi.** 2005. Interactions of NF- $\kappa$ B with chromatin: the art of binding at the right place at the right time. *Nat. Immunol.* **6**: 439-445.

**Neméth, Z.H., S.J. Leibovich, E.A. Deitch, B. Sperlágh, L. Virág, E.S. Vizi, C. Szabó, and G. Haskó.** 2003. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **312**: 883-888.

**Nicholson, D.W. & N.A. Thornberry.** 1997. Caspases: killer proteases. *TIBS* **22**: 299-306.

**Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura, and Y. Sugino.** 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acid Res.* **18**: 6169.

**Ohmori, Y., G. Strassman, and T.A. Hamilton.** 1990. cAMP differentially regulates expression of mRNA encoding IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **145**: 3333-3339.

**Old, L.J.** 1988. Der Tumor-Nekrose-Faktor. *Spektrum der Wissenschaft.* **7**: 42-51.

**Ollivier, V., G.C. Parry, R.R. Cobb, D. de Prost, and N. Mackman.** 1996. Elevated cyclic AMP inhibits NF- $\kappa$ B-mediated transcription in human monocyte cells and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 20828-20835.

**Pahan, K., F.G. Sheikh, A.M. Namboodiri, and I. Singh.** 1998. N-acetyl cysteine inhibits induction of NO production by endotoxin or cytokine stimulated rat peritoneal macrophages, C6 glial cells and astrocytes. *Free Radical Biol. Med.* **24**: 39-48.

**Palladino, M.A., F.R. Bahjat, E.A. Theodorakis, and L.L. Moldawer.** 2003. Anti-TNF $\alpha$  therapies: the next generation. *Nature* **2**: 736-746.

**Pang, L. & J.R. Hoult.** 1997. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E2 and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **53**: 493-500.

**Papanicolaou, D.A., R.L. Wilder, S.C. Manolagas, and G.P. Chrousos.** 1998. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. NIH conference. *Ann. Intern. Med.* **128**: 127-137.

**Parry, G.C. & N. Mackman.** 1997. Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated transcription. *J. Immunol.* **159**: 5450-5456.

**Perera, P.-Y., N. Qureshi, W.J. Christ, P. Stütz, and S.N. Vogel.** 1998. Lipopolysaccharide and its analog antagonists display differential serum factor dependencies for induction of cytokine genes in murine macrophages. *Infect. Immun.* **66**: 2562-2569.

**Perkins, N.D.** 2000. The Rel/NF- $\kappa$ B family: friend and foe. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 434-440.

**Petrova, T.V., K.T. Akama, and L.J. Van Eldik.** 1999. Selective modulation of BV2 microglial activation by prostaglandin E<sub>2</sub>. Differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *J. Biol. Chem.* **274**: 28823-28827.

**Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Alanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler.** 1998 a. Defective LPS signaling in CeH/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**: 2085-2088.

**Poltorak, A., I. Smirnova, X. He, M.Y. Liu, C. van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E.K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S.N. Vogel, and B. Beutler.** 1998 b. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol. Dis.* **42**: 340-355.

**Poltorak, A., P. Ricciardi-Castagnoli, S. Citterio, and B. Beutler.** 2000. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 2163-2167.

**Pyne, N.J., D. Tolan, and S. Pyne.** 1997. Bradykinin stimulates cAMP synthesis via mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin E2 release in airway smooth muscle. *Biochem. J.* **328**: 689-694.

**Qureshi, S.T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros, and D. Malo.** 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr 4). *J. Exp. Med.* **189**: 615-625.

**Raabe, T., M. Bukrinsky, and R.A. Currie.** 1998. Relative contribution of transcription and translation to the induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **273**: 974-980.

- Ratovitski, E.A., C. Bao, R.A. Quick, A. McMillan, C. Kozlovsky, and C.J. Lowenstein.** 1999. An inducible nitric-oxide synthase (NOS)-associated protein inhibits NOS dimerization and activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 30250-30257.
- Remick, D., G. Villarete, and L. Villarete.** 1996. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.* **59**: 471-475.
- Reth, M.** 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* **3**: 1129-1134.
- Rhoades, K.L., S.H. Golub, and J.S. Economou.** 1992. The regulation of the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter region in macrophage, T cell and B cell lines. *J. Biol. Chem.* **267**: 22102-22107.
- Rice, N.R. & M.K. Ernst.** 1993. *In vivo* control of NF- $\kappa$ B activation by I $\kappa$ B $\alpha$ . *EMBO J.* **12**: 4685-4695.
- Rietschel, E.T. & H. Brade.** 1993. Bakterielle Endotoxine. *Spektrum der Wissenschaft* **1**: 34-42.
- Roach, J.C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M.K. Purcell, K.D. Smith, L.E. Hood, and A. Aderem.** 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *PNAS* **102**: 9577-9582.
- Rubartelli, A., F. Cozzolino, M. Talio, and R. Sitia.** 1990. A novel secretory pathway for IL-1 $\beta$ , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**: 1503-1510.
- Rubartelli, A., A. Bajetto, G. Allavena, F. Cozzolino, and R. Sitia.** 1993. Post-translational regulation of interleukin 1 $\beta$  secretion. *Cytokine* **5**: 117-124.
- Rudolph, D., A. Tafuri, P. Gass, G.J. Hammerling, B. Arnold, and G. Schutz.** 1998. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4481-4486.
- Ryan, K.A., M.F. Smith Jr., M.K. Sanders, and P.B. Ernst.** 2004. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate toll-like 4-mediated activation of NF- $\kappa$ B and interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* **72**: 2123-2130.
- Saigusa, T.** 1990. Participation of interleukin-1 and tumor necrosis factor in the responses of the sympathetic nervous system during lipopolysaccharide-induced fever. *Pflügers Arch.* **416**: 225-229.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York, N.Y.
- Schilling, D.** 1996. Einfluss verschiedener Inhibitoren von intrazellulären Vorgängen der Signaltransduktion auf die Stimulierung von Makrophagen durch Oberflächenkomponenten Gram-negativer Bakterien. Diplomarbeit, TH Darmstadt.
- Schilling, D.** 2000. Untersuchungen zur differenzierten Regulation der Produktion proinflammatorischer Cytokine und Charakterisierung der negativen Regulation von Interleukin-1 $\beta$  in Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen. Dissertation, TU-Darmstadt.
- Schilling, D., T. Beißert, M.J. Fenton, and K. Nixdorff.** 2001. Negative regulation of IL-1 $\beta$  production at the level of transcription in macrophages stimulated with LPS. *Cytokine* **16**: 51-61.
- Schilling, D., K. Thomas, K. Nixdorff, S.N. Vogel, and M.J. Fenton.** 2002. Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages. *J. Immunol.* **169**: 5874-5880.
- Schmitz, M.L., S. Bacher, and M. Kracht.** 2001. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 186-190.
- Schnyder, J. & M. Baggiolini.** 1978. Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J. Exp. Med.* **148**: 435-450.



- Schromm, A.B., K. Brandenburg, E.T. Rietschel, H.-D. Flad, S.F. Carroll, and U. Seydel.** 1996. Lipopolysaccharide-binding protein mediates CD14-independent intercalation of lipopolysaccharide into phospholipid membranes. *FEBS Lett.* **399**: 267-271.
- Schromm, A.B., K. Brandenburg, H. Loppnow, A.P. Moran, M.H. Koch, E.T. Rietschel, and U. Seydel.** 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2008-2014.
- Schwartz, D.A.** 2001. The role of TLR4 in endotoxin responsiveness in humans. *J. Endotoxin Res.* **7**: 389-393.
- Segal, A.W. & K.P. Shatwell.** 1997. The NADPH oxidase of phagocytic leukocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* **832**: 215-222.
- Senzer, N., S. Mani, A. Rosemurgy, J. Nemunaitis, C. Cunningham, C. Guha, N. Bayol, M. Gillen, K. Chu, C. Rasmussen, H. Rasmussen, D. Kufe, R. Weichselbaum, and N. Hanna.** 2004. TNFerade biologic, an adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor  $\alpha$  gene: a phase I study in patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **22**: 592-601.
- Shakhov, A.N., M.A. Collart, P. Vassalli, S.A. Nedospasov, and C.V. Jongeneel.** 1990. Kappa-B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.* **171**: 35-47.
- Shaywitz, A.J. & M.E. Greenberg.** 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 821-861.
- Sheng, M., M.A. Thompson, and M.E. Greenberg.** 1991. CREB: a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**: 1427-1430.
- Shirakawa, F., K. Saito, C.A. Bonagura, D.L. Galson, M.J. Fenton, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1993. The human prointerleukin  $1\beta$  gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1332-1344.
- Simm, A. & H.-J. Brömmel.** 2005. Reactive oxygen species (ROS) and aging: Do we need them – can we measure them – should we block them? *Sign. Transd.* **3**: 115-125.
- Smith, M.F., Jr., D. Eidlen, W.P. Arend, and A. Gutierrez-Hartmann.** 1994. LPS-induced expression of the human IL- $1\beta$  receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements. *J. Immunol.* **153**: 3584-3593.
- Stamler, J.S., D.J. Singel, and J. Loscalzo.** 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* **258**: 1898-1902.
- Stark, G.R., I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, and R.D. Schreiber.** 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 227-264.
- Stuehr, D.J. & C.F. Nathan.** 1989. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**: 1543-1555.
- Sugiyama, T., M. Fujita, N. Koide, I. Mori, T. Yoshida, H. Mori, and T. Yokochi.** 2004. 2-Aminopurine inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by preventing IFN- $\beta$ . *Microbiol. Immunol.* **48**: 957-963.
- Sultz, B.M.** 1968. Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. *Nature* **219**: 1253-1254.
- Sun, S.-C., S.B. Maggirwar, and E. Harhaj.** 1995. Activation of NF- $\kappa\text{B}$  by phosphatase inhibitors involves the phosphorylation of I $\kappa\text{B}\alpha$  at phosphatase 2A-sensitive sites. *J. Biol. Chem.* **270**: 18347-18351.
- Taff, R. & M. Sitkovsky.** 1994. Granule enzyme exocytosis assay for cytotoxic T lymphocyte activation. Assay for lactate dehydrogenase to measure granule release by damaged cells. p.3.16.1-3.16.8. *In* J.E. Coligan, A.M.

Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober (ed.), Current Protocols in Immunology, John Wiley and sons, Inc., New York, N.Y.

**Taffet, S.M., K.J. Singhel, J.F. Overholtzer, and S.A. Shurtleff.** 1989. Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cell. Immunol.* **120**: 291-300.

**Tamaoki, T.** 1991. Use and specificity of staurosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol.* **201**: 340-347.

**Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariat, P. Cohen, and M.J. Comb.** 1996. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP-kinase-2. *EMBO J.* **15**: 4629-4642.

**Tannenbaum, C.S. & T.A. Hamilton.** 1989. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *J. Immunol.* **142**: 1274-1280.

**Teixeira, M.M., R.W. Gristwood, N. Cooper, and P.G. Hellewell.** 1997. Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? *Trends Pharmacol. Sci.* **18** : 164-171.

**Telford, J.L., G. Macchia, A. Massone, V. Carinci, E. Palla, and M. Melli.** 1986. The murine interleukin-1 $\beta$  gene: structure and evolution. *Nucl. Acid Res.* **14**: 9955-9963.

**Thannickal, V.J. & B.L. Fanburg.** 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**: L1005-L1028.

**Toshchakov, V., B.W. Jones, P.Y. Perera, K. Thomas, M.J. Cody, S. Zhang, B.R. Williams, J. Major, T.A. Hamilton, M.J. Fenton, and S.N. Vogel.** 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- $\beta$ -induced STAT1 $\alpha/\beta$ -dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* **3**: 392-398.

**Tremblay, P., M. Houde, N. Arbour, D. Rochefort, S. Masure, R. Mandeville, G. Opdenakker, and D. Oth.** 1995. Differential effects of PKC inhibitors on gelatinase B and interleukin 6 production in the mouse macrophage. *Cytokine* **7**: 130-136.

**Triantafilou, M. & K. Triantafilou.** 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**: 301-304.

**Triantafilou, M. & K. Triantafilou.** 2005. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J. Endotoxin Res.* **11**: 5-11.

**Triantafilou, M., K. Brandenburger, S. Kusumoto, K. Fukase, A. Mackie, U. Seydel, and K. Triantafilou.** 2004. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem. J.* **381**: 527-536.

**Tsuneyasu, K. & A. Shizuo.** 2002. Toll-like receptor as adjuvant receptor. *Biochem. Biophys. Acta* **1589**: 1-13.

**Ulevitch, R.J. & P.S. Tobias.** 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.

**Vegeto, E., S. Ghisletti, C. Meda, S. Etteri, S. Belcredito, and A. Maggi.** 2004. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17 $\beta$ -estradiol in macrophage cells. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **91**: 59-66.

**Verghese, M.W., R.T. McConnel, A.B. Strickland, R.C. Gooding, S.A. Stimpson, D.P. Yarnall, J.D. Taylor, and P.J. Furdon.** 1995. Differential regulation of human monocyte-derived TNF alpha and IL-1 beta by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**: 1313-1320.

**Vermeulen, L., G. De Wilde, S. Notebaert, W. Vanden Berghe, and G. Haegemann.** 2002. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem. Pharmacol.* **64**: 963-970.

**Vodovotz, Y., C. Bogdan, J. Paik, Q.W. Xie, and C. Nathan.** 1993. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **178**: 605-613.

**Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs.** 1968. An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **243**: 3763-3774.

**Weber, G., F. Link, E. Ferber, P.G. Munder, D. Zeitter, R.R. Bartlett, and K. Nixdorff.** 1993. Differential modulation of the effects of lipopolysaccharide on macrophages by a major outer membrane protein of *Proteus mirabilis*. *J. Immunol.* **151**: 415-424.

**Weinstein, S.L., M.R. Gold, and A.L. DeFranco.** 1991. Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4148-4152.

**Weston, C.R. & R.J. Davis.** 2002. The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 14-21.

**Westphal, O., O. Lüderitz, und F. Bister.** 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch.* 7b: 147-155.

**Wewers, M.D. & D.J. Herzyk.** 1989. Alveolar macrophages differ from blood monocytes in human IL-1 $\beta$  release. Quantitation by enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol.* **143**: 1635-1641.

**Whiteside, S.T., J.C. Epinat, N.R. Rice, and A. Israel.** 1997. I kappa B epsilon, a novel member of the I $\kappa$ B family, controls RelA and cRel NF- $\kappa$ B activity. *EMBO J.* **16**: 1413-1426.

**Woo, M.-S., S.-H. Jung, J.-W. Hyun, and H.-S. Kim.** 2004. Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine gene expression by forskolin and dibutyryl-cAMP in lipopolysaccharide-stimulated murine BV2 microglial cells. *Neurosc. Lett.* **356**: 187-190.

**Wright, S.D.** 1991. Multiple receptors for endotoxin. *Curr. Op. Immunol.* **3**: 83-90.

**Wright, S.D. & R.N. Kolesnick.** 1995. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *Immunol. Today* **16**: 297-302.

**Wu, G.-Y., K. Deisseroth, and R.W. Tsien.** 2001. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS* **98**: 2808-2813.

**Xie, Q.W., W. Kashiwabara, and C. Nathan.** 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**: 4705-4708.

**Xie, Q.W., H.J. Cho, J. Calaycay, R.A. Mumford, K.M. Swiderek, T.D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan.** 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**: 225-228.

**Xie, Q.W., R. Whisnant, and C. Nathan.** 1993. Promotor of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**: 1779-1784.

**Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X.F. Lei, and M.K. Achong.** 1998. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* **101**: 311-320.

**Xing, J., D.D. Ginty, and M.E. Greenberg.** 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**: 959-963.

**Yamamoto, K.K., G.A. Gonzales, W.D. Biggs, and M.R. Montminy.** 1988. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* **334**: 494-498.

**Yao, J., N. Mackman, T.S. Edgington, and S.T. Fan.** 1997. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter in human monocytic cells: regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- $\kappa$ B transcription factors. *J. Biol. Chem.* **272**: 17795-17801.

**Yao, T.P., S.P. Oh, M. Fuchs, N.D. Zhou, L.E. Ch'ng, D. Newsome, R.T. Bronson, E. Li, D.M. Livingston, and R. Eckner.** 1998. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**: 361-372.

**Yoza, B.K., J.D. Wells, and C.E. McCall.** 1998. Interleukin-1 $\beta$  expression after inhibition of protein phosphatases in endotoxin-tolerant cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 281-287.

**Zitnik, R.J., T. Zheng, and J.A. Elias.** 1993. cAMP inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **264**: L253-L260.

**Zor, T. & Z. Selinger.** 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**: 302-308.

## Wertetabellen zu den Abbildungen

**Wertetabelle zu Abbildung 18:** Konzentrations-abhängiger Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

|                          | IL-1 $\beta$ -Produktion in den Zell-Lysaten [pg/ml] |
|--------------------------|--|
| Medium                   | 16 $\pm$ 3   |
| LPS                      | 3027 $\pm$ 371                                       |
| LPS + cAMP [50 $\mu$ M]  | 4565 $\pm$ 632                                       |
| LPS + cAMP [100 $\mu$ M] | 7353 $\pm$ 22  |
| LPS + cAMP [200 $\mu$ M] | 10557 $\pm$ 1657                                     |
| LPS + cAMP [400 $\mu$ M] | 12526 $\pm$ 1593                                     |

**Wertetabelle zu Abbildung 19:** Einfluss von dB-cAMP auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-1 $\beta$ -Produktion in den Zell-Lysaten [pg/ml] |                 |
|----------------------|--|-----------------|
|                      | LPS  | LPS + cAMP      |
| 0                    | 45 $\pm$ 23  | 144 $\pm$ 49    |
| 2                    | 952 $\pm$ 374  | 3348 $\pm$ 840  |
| 4                    | 3848 $\pm$ 825                                       | 8704 $\pm$ 1963 |
| 6                    | 4921 $\pm$ 801                                       | 9273 $\pm$ 1839 |
| 8                    | 5823 $\pm$ 1474                                      | 6757 $\pm$ 1791 |
| 12                   | 3718 $\pm$ 871                                       | 8243 $\pm$ 1810 |
| 16                   | 1957 $\pm$ 654                                       | 4919 $\pm$ 1711 |
| 20                   | 1325 $\pm$ 349                                       | 3812 $\pm$ 971  |
| 24                   | 1077 $\pm$ 389                                       | 3513 $\pm$ 1038 |

**Wertetabelle zu Abbildung 20:** Einfluss von dB-cAMP auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-1 $\beta$ -mRNA-Level |            |
|----------------------|--------------------------|------------|
|                      | LPS                      | LPS + cAMP |
| 0                    | 0,00                     | 0,02       |
| 4                    | 1,66                     | 3,07       |
| 6                    | 1,87                     | 3,19       |
| 8                    | 2,07                     | 3,06       |
| 12                   | 1,39                     | 2,41       |
| 16                   | 0,66                     | 1,76       |
| 29                   | 1,32                     | 2,37       |
| 24                   | 0,26                     | 2,04       |

**Wertetabelle zu Abbildung 21:** Konzentrations-abhängiger Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

|                          | IL-1 $\beta$ -Produktion in den Zell-Lysaten [pg/ml] |
|--------------------------|--|
| Medium                   | 13 $\pm$ 14  |
| LPS                      | 458 $\pm$ 109  |
| LPS + Roli [10 $\mu$ M]  | 1031   |
| LPS + Roli [50 $\mu$ M]  | 2071   |
| LPS + Roli [100 $\mu$ M] | 4333 $\pm$ 547                                       |
| LPS + Roli [200 $\mu$ M] | 5581 $\pm$ 1017                                      |

**Wertetabelle zu Abbildung 22:** Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubation [h] | IL-1 $\beta$ -Produktion [pg/ml] |                 |
|----------------|----------------------------------|-----------------|
|                | LPS                              | LPS + Rolipram  |
| 0              | 8 $\pm$ 18                       | 547 $\pm$ 218   |
| 2              | 1946 $\pm$ 798                   | 654 $\pm$ 437   |
| 4              | 4741 $\pm$ 1047                  | 2907 $\pm$ 1330 |
| 6              | 5422 $\pm$ 913                   | 4480 $\pm$ 1593 |
| 8              | 5071 $\pm$ 1110                  | 4469 $\pm$ 1011 |
| 12             | 5484 $\pm$ 344                   | 9413 $\pm$ 677  |
| 16             | 3548 $\pm$ 607                   | 9797 $\pm$ 715  |
| 20             | 939 $\pm$ 623                    | 6222 $\pm$ 1440 |
| 24             | 637 $\pm$ 435                    | 7160 $\pm$ 1683 |

**Wertetabelle zur Abbildung 23:** Einfluss von Rolipram auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-1 $\beta$ -mRNA-Level |                 |
|----------------------|--------------------------|-----------------|
|                      | LPS                      | LPS + Rolipram  |
| 0                    | 0,12 $\pm$ 0,03          | 0,68 $\pm$ 0,23 |
| 2                    | 0,40 $\pm$ 0,03          | 1,34 $\pm$ 0,34 |
| 4                    | 0,85 $\pm$ 0,29          | 1,29 $\pm$ 0,22 |
| 6                    | 0,65 $\pm$ 0,05          | 1,41 $\pm$ 0,32 |
| 8                    | 0,60 $\pm$ 0,02          | 1,36 $\pm$ 0,39 |
| 12                   | 0,27 $\pm$ 0,05          | 2,19 $\pm$ 0,08 |
| 16                   | 0,32 $\pm$ 0,06          | 2,53 $\pm$ 0,46 |
| 20                   | 0,33 $\pm$ 0,06          | 2,03 $\pm$ 0,10 |
| 24                   | 0,36 $\pm$ 0,03          | 2,07 $\pm$ 0,04 |

**Wertetabelle zu Abbildung 25:** Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte Aktivität der vollständigen humanen IL-1 $\beta$ -*Enhancer*- und Promotor-Region in RAW 264.7-Makrophagen

| pXT-luc                      | x-fache Luciferaseaktivität über Hintergrund |
|------------------------------|--|
| Medium                       | 1  |
| LPS                          | 17 $\pm$ 6                                   |
| LPS + Rolipram [100 $\mu$ M] | 166 $\pm$ 5                                  |

**Wertetabelle zu Abbildung 27:** Einfluss von Rolipram auf die LPS-induzierte Aktivität der minimalen humanen IL-1 $\beta$ -*Enhancer*- und Promotor-Region in RAW 264.7-Makrophagen

| pX2-HT-luc                   | x-fache Luciferaseaktivität über Hintergrund |
|------------------------------|--|
| Medium                       | 1  |
| LPS                          | 12 $\pm$ 1                                   |
| LPS + Rolipram [100 $\mu$ M] | 21 $\pm$ 3                                   |

**Wertetabelle zu Abbildung 28:** Einfluss von Rolipram auf den CREB-abhängigen Promotor im Reportergenkonstrukt pCRE-luc

| pCRE-luc                | x-fache Luciferaseaktivität über Hintergrund |
|-------------------------|--|
| Medium                  | 1  |
| LPS                     | 2 ± 0  |
| LPS + Rolipram [100 µM] | 29 ± 4                                       |

**Wertetabelle zu Abbildung 30:** Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion in RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-1 $\beta$ -Produktion im Zell-Lysat |                  |
|----------------------|--|------------------|
|                      | LPS                                    | LPS + Tautomycin |
| 0                    | 36 ± 28                                | 331 ± 246        |
| 2                    | 1987 ± 700                             | 542 ± 237        |
| 4                    | 4041 ± 965                             | 3386 ± 1060      |
| 6                    | 4362 ± 839                             | 5900 ± 1170      |
| 8                    | 3921 ± 844                             | 6210 ± 946       |
| 12                   | 4757 ± 440                             | 8430 ± 836       |
| 16                   | 2808 ± 419                             | 8092 ± 675       |
| 20                   | 468 ± 95                               | 4559 ± 1043      |
| 24                   | 326 ± 72                               | 4686 ± 1084      |

**Wertetabelle zu Abbildung 31:** Einfluss von Tautomycin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-1 $\beta$ -mRNA-Level |             |
|----------------------|--------------------------|-------------|
|                      | LPS                      | LPS+Tau     |
| 0                    | 0,12 ± 0,03              | 0,34 ± 0,05 |
| 2                    | 0,40 ± 0,03              | 0,95 ± 0,21 |
| 4                    | 0,85 ± 0,29              | 1,84 ± 0,55 |
| 6                    | 0,65 ± 0,05              | 2,19 ± 0,23 |
| 8                    | 0,60 ± 0,02              | 2,21 ± 0,46 |
| 12                   | 0,27 ± 0,05              | 2,27 ± 0,11 |
| 16                   | 0,32 ± 0,06              | 2,75 ± 0,08 |
| 20                   | 0,33 ± 0,06              | 2,88 ± 0,30 |
| 24                   | 0,36 ± 0,03              | 2,71 ± 0,23 |

**Wertetabelle zu Abbildung 32:** Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte Aktivität der vollständigen humanen IL-1 $\beta$ -Enhancer- und Promotor-Region in RAW 264.7-Makrophagen

| pXT-luc                   | x-fache Luciferaseaktivität über Hintergrund |
|---------------------------|--|
| Medium                    | 1  |
| LPS                       | 17 ± 6                                       |
| LPS + Tautomycin [500 nM] | 83 ± 15                                      |

**Wertetabelle zu Abbildung 33:** Einfluss von Tautomycin auf die LPS-induzierte Aktivität der minimalen humanen IL-1 $\beta$ -Enhancer- und Promotorregion in RAW 264.7 Makrophagen

| pX2-HT-luc                | x-fache Luciferaseaktivität über Hintergrund |
|---------------------------|--|
| Medium                    | 1  |
| LPS                       | 12 $\pm$ 1                                   |
| LPS + Tautomycin [500 nM] | 14 $\pm$ 3                                   |

**Wertetabelle zu Abbildung 34:** Einfluss von Tautomycin auf den CREB-abhängigen Promotor im Reportergenkonstrukt pCRE-luc

| pCRE-luc                  | x-fache Luciferaseaktivität über Hintergrund |
|---------------------------|--|
| Medium                    | 1  |
| LPS                       | 2 $\pm$ 0                                    |
| LPS + Tautomycin [500 nM] | 7 $\pm$ 1                                    |

**Wertetabelle zu Abbildung 36:** Einfluss von dB-cAMP auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | TNF $\alpha$ -Produktion [pg/ml] |                          |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------|
|                      | LPS                              | LPS + cAMP [100 $\mu$ M] |
| 0                    | - 32 $\pm$ 48                    | -80 $\pm$ 48             |
| 2                    | 14731 $\pm$ 2348                 | 10489 $\pm$ 637          |
| 4                    | 30042 $\pm$ 4544                 | 20851 $\pm$ 3868         |
| 6                    | 41955 $\pm$ 8356                 | 24256 $\pm$ 5730         |
| 8                    | 36591 $\pm$ 12908                | 20222 $\pm$ 9924         |
| 12                   | 34817 $\pm$ 725                  | 13983 $\pm$ 629          |
| 16                   | 38533 $\pm$ 2228                 | 17468 $\pm$ 40           |
| 20                   | 35629 $\pm$ 6980                 | 13274 $\pm$ 1496         |
| 24                   | 40587 $\pm$ 1560                 | 16426 $\pm$ 1003         |

**Wertetabelle zu Abbildung 37:** Einfluss von Rolipram auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | TNF $\alpha$ -Produktion [pg/ml] |                              |
|----------------------|----------------------------------|------------------------------|
|                      | LPS                              | LPS + Rolipram [100 $\mu$ M] |
| 0                    | -48 $\pm$ 77                     | 42 $\pm$ 47                  |
| 2                    | 1696 $\pm$ 270                   | 289 $\pm$ 234                |
| 4                    | 4092 $\pm$ 930                   | 246 $\pm$ 152                |
| 6                    | 5974 $\pm$ 843                   | 236 $\pm$ 105                |
| 8                    | 4938 $\pm$ 2235                  | 109 $\pm$ 110                |
| 12                   | 5640 $\pm$ 1238                  | -48 $\pm$ 33                 |
| 16                   | 6947 $\pm$ 2387                  | -106 $\pm$ 27                |
| 20                   | 6816 $\pm$ 508                   | 112 $\pm$ 83                 |
| 24                   | 7098 $\pm$ 1366                  | 61 $\pm$ 80                  |



**Wertetabelle zu Abbildung 38:** Einfluss von Rolipram auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | TNF $\alpha$ -mRNA-Level |                 |
|----------------------|--------------------------|-----------------|
|                      | LPS                      | LPS + Rolipram  |
| 0                    | 0,49 $\pm$ 0,05          | 0,73 $\pm$ 0,37 |
| 2                    | 2,62 $\pm$ 0,49          | 1,29 $\pm$ 0,59 |
| 4                    | 3,12 $\pm$ 0,18          | 1,05 $\pm$ 0,38 |
| 6                    | 3,14 $\pm$ 0,31          | 0,90 $\pm$ 0,32 |
| 8                    | 2,61 $\pm$ 0,13          | 1,00 $\pm$ 0,40 |
| 12                   | 0,68 $\pm$ 0,03          | 0,77 $\pm$ 0,40 |
| 16                   | 0,51 $\pm$ 0,07          | 0,51 $\pm$ 0,23 |
| 20                   | 0,56                     | 0,73 $\pm$ 0,36 |
| 24                   | 0,31                     | 0,61 $\pm$ 0,24 |

**Wertetabelle zu Abbildung 39:** Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | TNF $\alpha$ -Produktion [pg/ml] |                  |
|----------------------|----------------------------------|------------------|
|                      | LPS                              | LPS + Tautomycin |
| 0                    | -48 $\pm$ 77                     | 49 $\pm$ 82      |
| 2                    | 1696 $\pm$ 270                   | 665 $\pm$ 260    |
| 4                    | 4092 $\pm$ 930                   | 3504 $\pm$ 991   |
| 6                    | 5974 $\pm$ 843                   | 9402 $\pm$ 1420  |
| 8                    | 4938 $\pm$ 2235                  | 9571 $\pm$ 2318  |
| 12                   | 5640 $\pm$ 1238                  | 7147 $\pm$ 797   |
| 16                   | 6947 $\pm$ 2387                  | 9084 $\pm$ 649   |
| 20                   | 6818 $\pm$ 508                   | 13132 $\pm$ 1169 |
| 24                   | 7098 $\pm$ 1366                  | 14519 $\pm$ 2860 |

**Wertetabelle zu Abbildung 40:** Einfluss von Tautomycin auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Akkumulation in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | TNF $\alpha$ -mRNA-Level |                  |
|----------------------|--------------------------|------------------|
|                      | LPS                      | LPS + Tautomycin |
| 0                    | 0,43 $\pm$ 0,01          | 0,70 $\pm$ 0,29  |
| 2                    | 2,35 $\pm$ 0,04          | 2,24 $\pm$ 0,24  |
| 4                    | 2,30 $\pm$ 0,24          | 2,30 $\pm$ 0,34  |
| 6                    | 1,27 $\pm$ 0,15          | 1,55 $\pm$ 0,02  |
| 8                    | 1,26 $\pm$ 0,02          | 1,82 $\pm$ 0,34  |
| 12                   | 0,60 $\pm$ 0,05          | 1,40 $\pm$ 0,16  |
| 16                   | 0,39 $\pm$ 0,06          | 1,04 $\pm$ 0,09  |
| 20                   | 0,43                     | 1,53 $\pm$ 0,29  |
| 24                   | 0,24                     | 1,36 $\pm$ 0,34  |

**Wertetabelle zu Abbildung 41:** Einfluss von dB-cAMP auf die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-6-Produktion [pg/ml] |               |
|----------------------|-------------------------|---------------|
|                      | LPS                     | LPS + cAMP    |
| 0                    | 57 ± 199                | 1381 ± 957    |
| 2                    | 1563 ± 16               | 2352 ± 709    |
| 4                    | 12187 ± 1129            | 19831 ± 1745  |
| 6                    | 26573 ± 6592            | 47623 ± 9554  |
| 8                    | 26548 ± 11098           | 54494 ± 13804 |
| 12                   | 37625 ± 1862            | 65926 ± 3834  |
| 16                   | 51748 ± 456             | 85629 ± 17183 |
| 20                   | 40667 ± 755             | 71168 ± 9656  |
| 24                   | 51691 ± 1475            | 79287 ± 13847 |

**Wertetabelle zu Abbildung 42:** Einfluss von Rolipram auf die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-6-Produktion [pg/ml] |                |
|----------------------|-------------------------|----------------|
|                      | LPS                     | LPS + Rolipram |
| 0                    | 57 ± 199                | 12880 ± 865    |
| 2                    | 1563 ± 16               | 21969 ± 7939   |
| 4                    | 12187 ± 1129            | 35824 ± 8982   |
| 6                    | 26573 ± 6592            | 27378 ± 8943   |
| 8                    | 26548 ± 11098           | 40107 ± 11985  |
| 12                   | 37625 ± 1862            | 21969 ± 7939   |
| 16                   | 51748 ± 456             | 35824 ± 8982   |
| 20                   | 40667 ± 755             | 27378 ± 8943   |
| 24                   | 51691 ± 1475            | 40107 ± 11985  |

**Wertetabelle zu Abbildung 43:** Einfluss von Tautomycin auf die IL-6-Produktion in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | IL-6-Produktion [pg/ml] |                  |
|----------------------|-------------------------|------------------|
|                      | LPS                     | LPS + Tautomycin |
| 0                    | 57 ± 199                | -319 ± 239       |
| 2                    | 1563 ± 16               | -168 ± 391       |
| 4                    | 12187 ± 1129            | 1902 ± 702       |
| 6                    | 26573 ± 6592            | 5078 ± 4211      |
| 8                    | 26548 ± 11098           | 6291 ± 5406      |
| 12                   | 37625 ± 1862            | 6187 ± 2870      |
| 16                   | 51748 ± 456             | 13220 ± 8271     |
| 20                   | 40667 ± 755             | 7905 ± 4956      |
| 24                   | 51691 ± 1475            | 12321 ± 8784     |

**Wertetabelle zu Abbildung 44:** Einfluss von dB-cAMP auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | NO-Produktion [ $\mu\text{M}$ ] |            |
|----------------------|---------------------------------|------------|
|                      | LPS                             | LPS + cAMP |
| 0                    | $2 \pm 1$                       | $2 \pm 1$  |
| 2                    | $2 \pm 1$                       | $2 \pm 1$  |
| 4                    | $2 \pm 1$                       | $2 \pm 1$  |
| 6                    | $3 \pm 1$                       | $3 \pm 1$  |
| 8                    | $3 \pm 0$                       | $4 \pm 0$  |
| 12                   | $12 \pm 0$                      | $15 \pm 1$ |
| 16                   | $18 \pm 0$                      | $22 \pm 1$ |
| 20                   | $20 \pm 1$                      | $23 \pm 1$ |
| 24                   | $24 \pm 0$                      | $30 \pm 2$ |

**Wertetabelle zu Abbildung 45:** Einfluss von Rolipram auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | NO-Produktion [ $\mu\text{M}$ ] |                |
|----------------------|---------------------------------|----------------|
|                      | LPS                             | LPS + Rolipram |
| 0                    | $2 \pm 1$                       | $0 \pm 0$      |
| 2                    | $2 \pm 1$                       | $2 \pm 1$      |
| 4                    | $2 \pm 1$                       | $2 \pm 1$      |
| 6                    | $3 \pm 1$                       | $2 \pm 1$      |
| 8                    | $3 \pm 0$                       | $2 \pm 0$      |
| 12                   | $12 \pm 0$                      | $5 \pm 0$      |
| 16                   | $18 \pm 0$                      | $7 \pm 1$      |
| 20                   | $20 \pm 1$                      | $8 \pm 1$      |
| 24                   | $24 \pm 0$                      | $11 \pm 2$     |

**Wertetabelle zu Abbildung 46:** Einfluss von Tautomycin auf die Produktion von Stickstoffmonoxid in LPS-aktivierten RAW 264.7-Makrophagen

| Inkubationsdauer [h] | NO-Produktion [ $\mu\text{M}$ ] |                  |
|----------------------|---------------------------------|------------------|
|                      | LPS                             | LPS + Tautomycin |
| 0                    | $2 \pm 1$                       | $0 \pm 0$        |
| 2                    | $2 \pm 1$                       | $3 \pm 0$        |
| 4                    | $2 \pm 1$                       | $3 \pm 0$        |
| 6                    | $3 \pm 1$                       | $3 \pm 1$        |
| 8                    | $3 \pm 0$                       | $3 \pm 0$        |
| 12                   | $12 \pm 0$                      | $1 \pm 0$        |
| 16                   | $18 \pm 0$                      | $0 \pm 0$        |
| 20                   | $20 \pm 1$                      | $2 \pm 0$        |
| 24                   | $24 \pm 0$                      | $1 \pm 1$        |



## **Lebenslauf** **Sibylle Ohlweiler**

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>Geburtsdatum</b> | <i>7. Oktober 1976</i> in Erbach / Odenwaldkreis   |
| <b>Eltern</b>       | Gerd Ohlweiler, Schuldirektor<br>Inge Ohlweiler, geb. Straub, Debitoren-Buchhalterin   |
| <b>Schule</b>       | <i>1983 – 1987</i> Grundschule Vielbrunn-Michelstadt<br><i>1987 – 1989</i> Förderstufe Haupt- und Realschule Bad König<br><i>1989 – 1996</i> Gymnasium Michelstadt   |
| <b>Studium</b>      | <i>Oktober 1996 – April 2002</i><br>Biologie an der TU Darmstadt<br>Schwerpunktfächer: Mikrobiologie, Ökologie und Botanik<br><br><i>April 1998</i><br>Vordiplom<br><br><i>Oktober 1999 – Februar 2000</i><br>Studentische Hilfskraft am Institut für Zoologie der TU Darmstadt<br><br><i>April 2002</i><br>Diplom |
| <b>Promotion</b>    | <i>Juni 2002 – Mai 2005</i><br>Promotionsstipendiatin des Graduiertenkollegs 340<br>der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)<br><br><i>Juni 2005 – September 2005</i><br>Promotionsstipendiatin der FAZIT-Stiftung, Frankfurt  |